

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Hana Kubincová**

Kontrola buněčného dělení *Streptococcus pneumoniae* unikátní signální dráhou  
Control of cell division of *Streptococcus pneumoniae* by unique signaling pathway

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Konzultanti: RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D.,

RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D.

Praha, 2017

**Charles University**

**Faculty of Science**

Study programme: Biology

Branch of study: Microbiology



**Bc. Hana Kubincová**

Control of cell division of *Streptococcus pneumoniae* by unique signaling pathway  
Kontrola buněčného dělení *Streptococcus pneumoniae* unikátní signální dráhou

Diploma thesis

Supervisor: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Consultans: RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D.,

RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D.

Prague, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.08.2017

Podpis

Tato diplomová práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři buněčné signalizace pod odborným vedením **RNDr. Pavla Brannyho, CSc.**

#### Poděkování:

Mé poděkování patří celému kolektivu Laboratoře buněčné signalizace a ostatním kolegům z Mikrobiologického ústavu za cenné rady a přátelské prostředí. Jmenovitě pak zejména Pavlovi Brannymu, Aleši Ulrychovi, Denise Petráčkové a Lindě Doubravové za odborné vedení, cenné rady při sepisování této práce a ochotu kdykoli s čímkoli pomoci a poradit. Také bych ráda poděkovala Olivě, Silvii a Karolíně, rovněž za ochotu vždy pomoci a poradit.

Dále bych ráda poděkovala mé rodině za podporu a trpělivost během studií.

## Kontrola buněčného dělení *Streptococcus pneumoniae* unikátní signální dráhou

V genomu *S. pneumoniae* se nachází pouze jedna kopie genu kódující proteinkinázu StkP a fosfatázu PhpP eukaryotického typu. Tyto dva enzymy tvoří funkční signalizační pár regulující buněčné dělení buňky, čehož by se v budoucnu mohlo využít při tvorbě nového bakteriostatika. Nejenom kináza a fosfatáza jsou důležitými složkami systému, ale i ostatní členové této dráhy – specifické substráty těchto enzymů. Identifikace Ser/Thr fosfoproteomu se zaměřením na membránovou frakci poskytla informace nejenom o již známých substrátech jako LocZ, Jag a DivIVA, ale také o neznámém proteinu P15 s molekulovou hmotností kolem 15 kDa. Protein byl v rámci této práce pomocí MS MALDI TOF identifikován jako rhodanáza (*spr0595*), ale jeho následná delece jej jako možný substrát StkP/PhpP nepotvrdila. Proto bylo přistoupeno k ověření jiného substrátu, proteinu FtsA, který byl již v předešlých studiích identifikován jako substrát této kinázy (Beilharz *et al.*, 2012). FtsA je esenciální protein buněčného dělení, který kotví filamenta FtsZ do membrány. Fosforylace tohoto proteinu byla detekována na Thr zbytku v pozici 404. Pomocí fosfoablativní záměny *in vitro* a *in vivo* bylo zjištěno, že Thr404 je skutečně fosforylován proteinkinázou StkP, ale FtsA obsahuje ještě další, dosud neidentifikované fosfoakceptorové zbytky.

Dále byla snaha ověřit, zda je kmen kódující pouze ektopickou kopii genu *ftsA-T404A* s fosfoablativní záměnou životaschopný. Vzhledem k esencialitě FtsA byl za tímto účelem připraven merodiploidní kmen, obsahující *ftsA* v nativním lokusu a jeho mutovanou kopii v postradatelném *bgaA* lokusu pod kontrolou zinkového indukibilního promotoru. V přítomnosti  $Zn^{2+}$  mohlo být pak *ftsA* z nativního lokusu odstraněno. To se ale v rámci této práce nepodařilo, tudíž nemohlo být ověřeno, jaký má mutace T404A vliv na funkci FtsA.

**Klíčová slova:** *Streptococcus pneumoniae*, StkP, buněčné dělení, fosfoproteom, FtsA

# Control of cell division of *Streptococcus pneumoniae* by unique signaling pathway

Genome of *S. pneumoniae* contains only one copy of the gene coding eukaryotic type protein kinase StkP and corresponding phosphatase PhpP. These two enzymes form a functional signaling pair regulating cell division, which could be used in the future for the design of new bacteriostatic compounds. Not only kinase and phosphatase are important components of the system, but also other members of this pathway - specific substrates of these enzymes. The identification of the Ser/Thr phosphoproteome with a focus on the membrane fraction provided information not only about already known substrates such as LocZ, Jag and DivIVA but also about an unknown protein P15 with a molecular weight about 15 kDa. In this thesis the protein was identified as rhodanase (*spr0595*) by MS MALDI TOF. However, its subsequent deletion did not confirm it as a StkP/PhpP substrate. Therefore we investigated another substrate, protein FtsA, which has already been identified as a substrate of this kinase in a previous study (Beilharz *et al.*, 2012). FtsA is an essential cell division protein that anchors FtsZ filaments into the membrane. Phosphorylation of this protein was detected on the Thr residue at position 404. Using phosphoablative substitution we found out, that Thr404 is indeed phosphorylated by protein kinase StkP, however, FtsA contains others, yet unidentified, phosphoacceptor residues.

In addition, an effort was made to verify whether the strain encoding only the ectopic copy of the *ftsA-T404A* gene with phosphoablative substitution is viable. Due to the essentiality of FtsA we prepared a merodiploid strain containing *ftsA* in the native locus and a mutated copy in a dispensable *bgaA* under the control of the zinc-inducible promoter. In the presence of  $Zn^{2+}$ , *ftsA* could have been removed from the native locus. However, we did not succeed to delete native *ftsA* and therefore it was not possible to investigate the impact of T404A mutation on the function of FtsA.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, StkP, cell division, phosphoproteome, FtsA

## Obsah

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>11</b>
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	11
2.6. Buněčné dělení .....	12
2.6.1. Růst a dělení tyčinkovitých bakterií .....	12
2.6.2. Růst a dělení <i>S. pneumoniae</i> .....	14
2.6.2.1. Důležité proteiny buněčného dělení .....	16
2.6.3. FtsA .....	19
2.6.3.1.1 Struktura .....	21
2.7. Regulace buněčného dělení prostřednictvím Ser/Thr proteinkináz .....	22
2.7.1. Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs) .....	22
2.7.1.1. PASTA domény .....	24
2.7.2. Přenos signálů <i>S. pneumoniae</i> .....	25
2.7.2.1. StkP proteinkináza .....	25
2.7.2.1.1 Identifikované substráty kinázy StkP <i>S. pneumoniae</i> .....	27
2.7.2.2. PhpP fosfatáza .....	30
2.8. Fosfoproteom – separační a obohacovací techniky .....	31
2.8.1. Gelové metody separace fosfoproteinů .....	32
2.8.2. Negelové metody separace fosfopeptidů .....	33
2.8.2.1. Identifikace a kvantifikace fosfoproteomu pomocí hmotnostní spektrometrie .....	35
2.8.2.1.1 Izotopové značení proteinů (iTRAQ) .....	35
2.8.2.1.2 Kvantifikace bez použití izotopových značek („label free“) .....	35
2.8.3. Metody obohacení fosfoproteinů a fosfopeptidů – afinitní metody .....	36
<b>3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>40</b>
4.1. Biologický materiál .....	40
4.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	40
4.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	41
4.2. Vektory .....	42
4.3. Technické zázemí .....	44
4.4. Chemikálie .....	45
4.5. Pufry a roztoky .....	46
4.6. Půdy a média .....	48
4.7. Enzymy .....	48
4.8. Kazety .....	48
4.8.1. Sweet Janus kazeta ( <i>sacB-kan-rpsL</i> ) .....	48
4.9. Protilátky .....	49

<b>4.10.</b>	<b>Komerční soupravy a standardy .....</b>	<b>49</b>
<b>4.11.</b>	<b>Použití oligonukleotidy .....</b>	<b>50</b>
<b>4.12.</b>	<b>Kultivace bakterií .....</b>	<b>51</b>
4.12.1.	Kultivace <i>S. pneumoniae</i> .....	51
4.12.1.1.	Glycerolové konzervy pro uchování <i>S. pneumoniae</i> .....	51
4.12.2.	Kultivace <i>E. coli</i> .....	52
4.12.2.1.	Glycerolové konzervy pro uchování <i>E. coli</i> .....	52
<b>4.13.</b>	<b>Manipulace s <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>52</b>
4.13.1.	Mikroskopie .....	52
4.13.2.	Transformace DNA do buněk <i>S. pneumoniae</i> .....	52
4.13.3.	Izolace proteinů z kultur <i>S. pneumoniae</i> .....	53
4.13.3.1.	Příprava rychlých proteinových vzorků z kultur <i>S. pneumoniae</i> chemická dezintegrace buněk - SEDS lyzáty .....	53
4.13.3.2.	Izolace celkové proteinové frakce <i>S. pneumoniae</i> – „FastPrep“ .....	53
4.13.3.3.	Izolace membránové frakce <i>S. pneumoniae</i> .....	54
4.13.3.4.	Purifikace fosforylovaných membránových bílkovin <i>S. pneumoniae</i> pomocí „P-Threonine antibody - polyclonal Rabbit (magnetic bead conjugate)“ .....	54
4.13.3.5.	Purifikace proteinů fúzovaných s GFP značkou z bakterií <i>S. pneumoniae</i> - GFP-Trap®_MA kit .....	54
<b>4.14.</b>	<b>Manipulace s <i>E. coli</i> .....</b>	<b>55</b>
4.14.1.	Izolace plasmidové DNA .....	55
4.14.2.	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> .....	55
4.14.3.	Transformace plasmidové DNA do buněk <i>E. coli</i> .....	55
4.14.4.	Expres proteinů pod IPTG inducibilním promotorem .....	56
4.14.5.	Izolace proteinů pomocí zařízení „French Press“ .....	56
4.14.6.	Purifikace proteinů pomocí histidinové značky (His Tag) .....	57
4.14.7.	Dialýza purifikovaných bílkovin .....	57
<b>4.15.</b>	<b>Manipulace s DNA .....</b>	<b>57</b>
4.15.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	57
4.15.2.	Cílená mutagenese .....	60
4.15.3.	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami .....	60
4.15.4.	Agarózová elektroforéza DNA .....	60
4.15.5.	Izolace DNA z gelu .....	61
<b>4.16.</b>	<b>Manipulace s proteiny .....</b>	<b>61</b>
4.16.1.	Stanovení koncentrace bílkovin pomocí BCA .....	61
4.16.2.	Kinázová reakce in vitro .....	61
4.16.3.	Srážení proteinů .....	62
4.16.4.	1-D polyakrylamidová elektroforéza (1-DE) .....	62
4.16.4.1.	Složení gelů pro 1-DE .....	62
4.16.5.	2-D elektroforéza .....	63
4.16.6.	Přenos proteinů na PVDF membránu (Western blot) .....	64
4.16.7.	Detekce bílkovin .....	64
4.16.7.1.	Detekce proteinů koloidní Coomassie Blue .....	64
4.16.7.2.	Imunodetekce .....	64
4.16.7.3.	Kvantifikace fosforylace proteinů .....	65
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1.</b>	<b>Analýza fosfoproteomu <i>S. pneumoniae</i> zaměřená na identifikaci nízkomolekulárního proteinu P15 .....</b>	<b>67</b>
5.1.1.	Ověření rhodanázy (Spr0595) jako substrátu proteinkinázy StkP .....	72
5.1.1.1.	Příprava delečního kmene <i>S. pneumoniae</i> pro delecí genu <i>spr0595</i> .....	73
5.1.1.2.	Příprava delečního konstruktů <i>spr0595::SweetJanus</i> .....	73



5.1.1.3.	Transformace <i>S. pneumoniae</i> delečním konstruktem <i>spr0595::SweetJanus</i> .....	75
5.1.1.4.	Příprava konstruktu <i>Δspr0595k</i> .....	76
5.1.1.5.	Transformace <i>S. pneumoniae</i> konstruktem <i>Δspr0595k</i> .....	77
5.1.1.6.	Ověření fosforylace proteinu Spr0595 kinázou StkP <i>in vivo</i> .....	79
<b>5.2.</b>	<b>Fosforylace proteinu FtsA <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i></b> .....	<b>80</b>
5.2.1.	Ověření fosforylačního místa proteinu FtsA <i>in vitro</i> .....	80
5.2.1.1.	Příprava vektoru pro expresi FtsA-T404A .....	81
5.2.1.2.	Testování exprese bílkovin FtsA, FtsA-T404A a StkP-KD v <i>E. coli</i> BL21 .....	84
5.2.1.3.	Purifikace bílkovin FtsA, FtsA-T404A, StkP-KD .....	86
5.2.1.4.	<i>In vitro</i> kinázová reakce s rekombinantními proteiny .....	88
5.2.1.5.	Separace izoform FtsA a FtsA-T404A pomocí 2-DE po kinázové reakci .....	91
5.2.2.	Ověření fosforylace proteinu FtsA <i>in vivo</i> .....	94
5.2.2.1.	Příprava vektoru kódující gen <i>gfp-ftsA-T404A</i> .....	94
5.2.2.2.	Transformace vektoru kódující gen <i>gfp-ftsA-T404A</i> do <i>E. coli</i> .....	95
5.2.2.3.	Transformace - příprava merodiploidních kmenů <i>S. pneumoniae</i> .....	95
5.2.2.4.	Testování exprese proteinů fúzovaných s GFP .....	98
5.2.2.5.	Morfologie merodiploidních kmenů a lokalizace proteinů fúzovaných s GFP .....	100
5.2.2.5.1	Měření velikosti buněk merodiploidních kmenů v závislosti na expresi mutované či nemutované formy FtsA .....	100
5.2.2.5.2	Lokalizace GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A .....	102
5.2.2.6.	Purifikace proteinů FtsA a FtsA-T404A z <i>S. pneumoniae</i> .....	104
5.2.3.	Delece nativního genu <i>ftsA</i> .....	107
5.2.3.1.	Transformace konstruktu <i>ftsA::P<sub>less</sub>cat</i> do FtsA merodiploidních kmenů <i>S. pneumoniae</i> .....	108
<b>6.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>113</b>
<b>6.1.</b>	<b>Substrát P15</b> .....	<b>113</b>
<b>6.2.</b>	<b>FtsA</b> .....	<b>116</b>
<b>7.</b>	<b>SOUHRN</b> .....	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>124</b>

## Seznam použitých zkratek

1-DE	jednorozměrná elektroforéza
2-DE	dvourozměrná elektroforéza
ADP	adenosintrifosfát
AmpR	ampicilinová rezistence
Arg	arginin
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bází
c	koncentrace
CCB	„Colloidal Coomassie Blue“
CF	cytoplazmatická frakce
Cm	chloramfenikol
CmR	chloramfenikolová rezistence
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EL	eluční frakce
eSTKPs	Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu
eSTPs	Ser/Thr proteinfosfatázy eukaryotického typu
GFP	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosintrifosfát
His	histidin
IDA	kyselina iminodioxetová
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
KanR	kanamycinová rezistence
kb	kilobáze
LC	kapalinová chromatografie
MF	membránová frakce
MS	hmotnostní spektrometrie
NTA	kyselina nitrilotrioxetová
O.D. <sub>600</sub>	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PASTA	„penicillin-binding protein and Serine/Threonine kinase associated“
PCR	polymerázová řetězcová reakce
<i>P<sub>czcD</sub></i>	inducibilní zinkový promotor
PG	peptidoglykan
P-Thr	fosfo-treonin
PVFD	polyvinylidendifluorid
SB	vzorkový pufr
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
Ser	serin
StkP-KD	kinázová doména proteinkinázy StkP
StrR	streptomycinová rezistence
StrS	streptomycinová senzitivita
SuS	sacharózová senzitivita
TCS	dvoukomponentové systémy
TetR	tetracyklinová rezistence
TEV	„tobacco etch virus“
Thr	treonin
T <sub>m</sub>	teplota tání
Tyr	tyrosin
W	oplachová frakce
WT	divoký typ

## 1. ÚVOD

Podmínky vnějšího prostředí pro růst bakteriálních buněk jsou velmi proměnlivé a často nepříznivé. Aby se buňky byly schopné rozdělit, musí se s těmito měnícími se podmínkami vyrovnat. Předpokladem k tomu je komunikace buňky s okolním prostředím a schopnost rychle a adekvátně na změny odpovídat a přizpůsobovat se. Za tímto účelem buňky disponují mechanismy, které rozpoznají signál přicházející z vnějšího prostředí a zprostředkují jeho přenos do nitra buňky. Jedním ze způsobů přenosu signálů jsou posttranslační proteinové modifikace fosforylace a defosforylace, zprostředkované ATP-dependentními proteinovými kinázami a fosfatázami. Kinázy přenášejí fosfátovou skupinu z molekuly ATP na hydroxyskupinu aminokyseliny svých substrátů - v případě Ser/Thr proteinkináz a Tyr proteinkináz na serin, threonin a tyrosin nebo v případě His a Arg proteinkináz na dusík postranních řetězců histidinu nebo argininu. Fosfatázy mají antagonistický účinek, uvádí proteiny do původního nefosforylovaného stavu.

U bakterií jsou proteinkinázy a fosfatázy součástí dvousložkových systémů (TCSs) nebo fosfoenolpyruvát dependentních fosfotransferázových systémů. U bakterií se také vyskytují kinázy, které jsou katalyticky a strukturně podobné eukaryotickým Ser/Thr proteinkinázám, tzv. bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKPs), které fosforylací substrátových proteinů regulují důležité buněčné procesy. Studium těchto signálních drah a jejich substrátů umožňuje lépe porozumět fyziologii buněk.

V genomu *S. pneumoniae*, grampozitivního extracelulárního lidského patogenu, je kódován pouze jeden pár genů kódujících proteinkinázu StkP a fosfatázu PhpP eukaryotického typu, díky čemuž je tato bakterie vhodným modelovým organismem pro studium tohoto typu enzymů. Studium a hlubší porozumění tohoto signálního systému a jimi fosforylovaných substrátů, regulujících buněčné dělení, by mohlo vést k vývoji nových alternativních způsobů antimikrobiální léčby. Některé substráty StkP již byly identifikovány, nicméně v membránové frakci *S. pneumoniae* byly detekovány alespoň 3 neznámé proteiny fosforylované na treoninových zbytcích (Ulrych *et al.*, 2016), jejichž identifikace a charakterizace povede ke komplexnějšímu porozumění funkce StkP/PhpP signálního páru.

První část této práce byla zaměřena na neznámé substráty StkP lokalizované v membráně *S. pneumoniae*, zejména na identifikaci membránového nízkomolekulárního proteinu P15 o neznámé funkci.

Druhá část této práce byla věnována fosforylaci cytoplazmatického proteinu buněčného dělení FtsA, jehož fosforylace byla identifikována v *S. pneumoniae* (Sun *et al.*, 2010). V nedávné studii byl tento protein *in vitro* kinázovou reakcí identifikován jako substrát kinázy StkP (Beilharz *et al.*, 2012).

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* je významný lidský extracelulární patogen objevený již v 19. století Louisem Pasteurem a Georgem Millerem Sternbergem, který je častou příčinou lidského úmrtí nejčastěji v důsledku selhání respiračního traktu. Tato bakterie zapříčiní ročně přes milion úmrtí (World Health Organization). *S. pneumoniae* je řazen mezi kataláza negativní koky. Je fakultativně anaerobní a energii získává fermentací. Pod mikroskopem je tato bakterie viditelná jako Gram-pozitivní diplokok lancetovitého tvaru. Buňky pneumokoka se také mohou vyskytovat samostatně nebo tvořit krátké řetízky. Na krevních miskách jsou kolonie obklopeny nazelenalou zónou, která je způsobena přeměnou hemoglobinu na verdoglobin peroxidem vodíku produkovaným bakteriemi řazenými do skupiny  $\alpha$ -hemolytických streptokoků. Od ostatních zástupců této skupiny je možné pneumokoka odlišit antibiotikem optochinem, vůči němuž je jako jediný  $\alpha$ -hemolytický streptokok citlivý (Bednář *et al.*, 1996). Na krevním agaru je také možné rozlišit nevirulentní neopouzdrěnou formu vyznačující se růstem kolonií s drsným povrchem (R - rough forma), od virulentní opouzdrěné formy, jejíž kolonie tvoří hladké (S - smooth) formy. Nevirulentní kmeny se vyskytují jako součást přirozené mikroflóry kolonizující horní cesty dýchací a jsou nebezpečné pro osoby se sníženou imunitou. Opouzdrěné kmeny mohou způsobit různá onemocnění. Nejčastěji bývají zmiňované záněty středního ucha, nosohltanu a dutin. Dále způsobují pneumonie, meningitidy, bakteriémie a mohou vyvolat dokonce i sepsi organismu (Julák, 2006; Shak *et al.*, 2012; Simell *et al.*, 2012).

Hlavní faktor patogenity je polysacharidové pouzdro. To je schopné vyřadit obranné mechanismy hostitele, které by invazi potlačily, např. chrání buňku před účinky fagocytózy tím, že zabraňuje adhezenci fagocytu na bakteriální buňku.

*S. pneumoniae* byl první bakterií, u které byla objevena schopnost kompetence pro genetickou transformaci. O tento objev se zasloužil v roce 1928 Frederick Griffith. Jedná se o jeden z přirozených způsobů přenosu genetické informace u některých G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakterií i některých Archebakterií. Transformující buňky jsou schopny přijímat úseky DNA o délce minimálně 500 nukleotidů, nacházející se v extracelulárním prostoru. Přijatá DNA může být u pneumokoka inkorporována homologní rekombinací do genomu a způsobit genetické změny. U rodu *Streptococcus* může být i 100 % buněk

kompetentních, ale jen během krátké periody růstového cyklu, za ideálních podmínek v 37 °C a po dosažení prahové hodnoty signální molekuly CSP („competence-stimulating peptide“) (Alloing *et al.*, 1998). Tého vlastnosti se dnes, mimo jiné, využívá pro genetické manipulace k přípravě nových mutantních kmenů umožňujících studium vlastností některých genů a je také příčinou vzrůstající antibiotické rezistence.

## **2.6. Buněčné dělení**

Jednotlivé druhy bakterií se liší velikostí a tvarem buněk (Angert, 2005; Young, 2010). Mohou být kokovitého či tyčinkovité tvaru, ale také různě zakřiveně spirální ba dokonce čtvercového tvaru. Rozdílná morfologie nasvědčuje tomu, že mezi nimi existují rozdílné mechanismy pro růst a dělení buněk. U většiny bakterií je za tvar buněk zodpovědná buněčná stěna, peptidoglykanová makromolekula obklopující cytoplazmatickou membránu, tvořená z glykanových řetězců, které jsou spojeny krátkými peptidy (Typas *et al.*, 2012). Buněčná stěna vyrovnává rozdíly vysokého intracelulárního nebo extracelulárního osmotického tlaku. Také ale potřebuje být přizpůsobitelná změnám tvaru, nastávající během růstu a dělení. K tomuto účelu jsou v buňce přítomny proteiny, které společně remodelují buněčnou stěnu v průběhu růstu a dělení buněk. Jsou to penicilin-vazebné proteiny (PBPs; Penicillin-Binding Proteins) syntetizující peptidoglykan (PG) a jejich antagonisté autolyziny, hydrolyzující PG (Kocaoglu *et al.*, 2012).

Většina tyčinkovitých a některé kokovité bakterie s ovoidním tvarem, tzv. ovokoci, disponují dvěma typy PG syntézy. Jednak je nutné tvořit periferní PG struktury nezbytné pro prodlužování buněk a dále je potřeba syntetizovat septum, které je esenciální pro jejich rozdělení (Zapun *et al.*, 2008; Lovering *et al.*, 2012; Sham *et al.*, 2012). Kokovité bakterie kulovitého tvaru využívají pouze jeden typ syntézy PG a to v oblasti septa (Lleo *et al.*, 1990).

### **2.6.1. Růst a dělení tyčinkovitých bakterií**

Modelové tyčinkovité bakterie *E. coli* a *B. subtilis* disponují dvěma typy syntézy PG. Během dělení buněk dochází k syntéze PG v oblasti septa a prodlužování buněk je spojeno se syntézou PG periferních struktur buňky. Tyto dva procesy neprobíhají současně a jsou zprostředkovány specializovanými proteiny, které tvoří divizom zodpovědný za dělení (Goehring a Beckwith, 2005; Vicente *et al.*, 2006; Egan a Vollmer,

2013) nebo elongazom zodpovědný za prodlužovací růst (den Blaauwen *et al.*, 2008; Typas *et al.*, 2012). Nicméně v jiné studii bylo zjištěno, že tyto dvě mašinerie jsou na sobě závislé a že během syntézy PG septa může docházet k některým elongačním procesům (van der Ploeg *et al.*, 2013).

V případě *E. coli* je do dělicího procesu zapojeno víc jak dva tucty proteinů, z nichž některé jsou esenciální či částečně esenciální a tvoří základ dělicí mašinerie. Mezi nepostradatelné a částečně nepostradatelné proteiny patří FtsZ, FtsA, ZipA, FtsK, FtsE, FtsX, FtsQ, FtsB, FtsL, FtsW, PBP3 a FtsN, jejichž shromáždění do oblasti tvořící se dělicí přepážky je hierarchicky řízeno a povolání dalšího proteinu závisí na lokalizaci proteinů před ním nasedajících (de Boer, 2010; Lutkenhaus *et al.*, 2012; Egan a Vollmer, 2013; Huang *et al.*, 2013). Tento popis částečně platí i pro *B. subtilis* (Errington *et al.*, 2003). Avšak FtsA není pro *B. subtilis* esenciální, nicméně po jeho odstranění dochází ke vzniku několika Z-kruhů (Beall a Lutkenhaus, 1992) a protein ZipA se nevyskytuje u G+ bakterií včetně *B. subtilis*. Jeho funkci nahrazují ErzA (Levin *et al.*, 1999) a SepF (Ishikawa *et al.*, 2006). Také FtsN nebylo nalezeno u *B. subtilis* (Typas *et al.*, 2012).

Jako první nasedá do středu buňky eukaryotnímu tubulinu podobný protein FtsZ, který zde tvoří strukturu zvanou Z-kruh ještě před začátkem buněčného dělení (Bi a Lutkenhaus, 1991). Dále buď společně s FtsZ nebo ihned po jeho lokalizaci do středu buňky, nasedají do oblasti dělení FtsA a ZipA, které kotví FtsZ filamenta do membrány a tím stabilizují Z-kruh. Další jejich funkcí je povolání pozdních proteinů buněčného dělení, kódovaných na DNA za časnými proteiny buněčného dělení FtsZ, FtsA a ZipA ve směru transkripce, které jsou zodpovědné za dokončení divizomu (de Boer, 2010; Lutkenhaus *et al.*, 2012; Egan a Vollmer, 2013; Huang *et al.*, 2013).

U modelových tyčinkovitých bakterií elongační proces předchází buněčnému dělení. Prodlužování buněk se účastní jiná skupina proteinů než dělení. Jedná se o aktinu podobný protein MreB, který společně s membránou asociovanými proteiny MreC a MreD kontrolují a lokalizují syntézu PG periferních struktur nezbytnou pro elongaci buněk podél jejich podélné osy (van den Ent *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2005) a společně s membránou tvoří komplex, který je nezbytný pro lokalizaci proteinů RodA a PBP2 zapojených v laterálním prodlužování buněk. Odstranění genů kódujících tyto proteiny, MreB, MreC, MreD, RodA a PBP2, z genomu *E. coli*, vede ke vzniku velkých kulatých buněk, neschopných se dělit a se sklony k lýzi. Jejich nepostradatelnost však může být mimo jiné vynahrazena nadprodukcí FtsZ (Vinella *et al.*, 1993; de Pedro

*et al.*, 2001; Bendežú a de Boer, 2008). Před pár lety byl identifikován další protein elongazomu, RodZ (Shiomi *et al.*, 2008). Jedná se o bitopický membránový protein, který u *E. coli* interaguje s MreB a je zodpovědný za správný tvar buňky (Bendežú *et al.*, 2009; Gerdes, 2009). Elongační mašinérie *B. subtilis* obsahuje podobnou sadu proteinů jako v případě *E. coli*, ale obsahuje kromě MreB ještě jeho homolog Mbl a MreBH (Carballido-López a Formstone, 2007). Navíc je u *B. subtilis* přítomný protein zodpovědný za správný tvar tyčinkovitých buněk, GpsB, který u *E. coli* není přítomen (Claessen *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008).

### 2.6.2. Růst a dělení *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* je zástupce ovoidních bakterií, které disponují oběma typy syntézy PG, přičemž 46-50 % buněčného cyklu je věnováno elongaci buněk (Wheeler *et al.*, 2011). Jak periferní, tak i septální mašinérie jsou obě lokalizovány do oblasti dělení ještě před začátkem buněčného cyklu (Lleó *et al.*, 1997). Buněčné dělení ovoidních bakterií začíná vznikem dělicí přepážky, pod mikroskopem viditelné jako ekvatoriální kruh ve středu buňky (Higgins a Shockman, 1970). Krátce poté vznikají po obou stranách nové kruhy, které označují střed budoucích nových buněk a mezi kterými je syntetizován nový periferní PG, vedoucí k prodlužování buněk (Wheeler *et al.*, 2011). Během elongace aktivita septální syntézy PG rychle vzrůstá. Po dokončení septa jsou dvě nově vzniklé dceřiné buňky odděleny PG hydrolázami (Higgins a Shockman, 1970; 1976).

V chromozómu *S. pneumoniae* jsou dle tohoto modelu kódovány geny proteinů, které jsou součástí prodlužovací mašinérie (elongazomu) anebo jsou součástí dělicí mašinérie (divizomu). Proteiny divizomu i elongazomu jsou lokalizovány do oblasti septa (Zapun *et al.*, 2008; Sham *et al.*, 2012). Výjimkou jsou DivIVA a hydroláza PcsB, které jsou součástí divizomu a které jsou lokalizovány jak v oblasti septa, tak na pólech buňky (Fadda *et al.*, 2007; Giefing-Kröll *et al.*, 2011; Sham *et al.*, 2012). Další výjimkou jsou proteiny PBP3 a DacB, které jsou součástí elongazomu, ale lokalizují na buněčném povrchu (Morlot *et al.*, 2003; Barendt *et al.*, 2011).

U *S. pneumoniae* jsou přítomny proteiny buněčného dělení vyskytující se u *B. subtilis* a jiných G<sup>+</sup> bakterií, zatímco některé proteiny přítomné v *E. coli*, jako jsou ZipA, ZapC, ZapD a FtsN, se u pneumokoka nevyskytují. Nejprve jsou lokalizovány do středu buňky proteiny časně fáze buněčného dělení. Jako první nasedá u *S. pneumoniae* LocZ/MapZ (Holečková *et al.*, 2015; Fleurie *et al.*, 2014), který



zodpovídá za výběr dělicího místa. Následují ho esenciální proteiny buněčného dělení FtsZ, který tvoří Z-kruh a FtsA, kotvící FtsZ filamenta do membrány (Morlot *et al.*, 2003; Lara *et al.*, 2005). Po nich se do dělicího procesu napojují proteiny syntetizující septum DivIB (FtsQ), DivIC (FtsB), FtsL, FtsW, PBP2x, PBP1a (Morlot *et al.*, 2003; 2004; Lara *et al.*, 2005), a DivIVA (Fadda *et al.*, 2007; Beilharz *et al.*, 2012).

PG je tvořen střídajícími se glykanovými řetězci N-acetylmuramové kyseliny a N-acetyl glukosaminu, které jsou spojeny krátkými peptidy (Vollmer *et al.*, 2008). PBPs katalyzují polymerizaci glykanových řetězců (glykosyltransferázová aktivita) a jejich propojení (transpeptidázová aktivita). Některé PBPs mají opačnou funkci. Hydrolyzují peptidové vazby spojující dva glykanové řetězce nebo poslední D-alanin pentapeptidového řetězce (Tipper a Strominger, 1965). *S. pneumoniae* disponuje 6 PBPs. PBP1a, PBP1b a PBP2a mající glykosyltransferázovou a transpeptidázovou aktivitu. Esenciální PBP2b a PBP2x disponují pouze transpeptidázovou aktivitou (Kell *et al.*, 1993; Song *et al.*, 2005) a během buněčného dělení jsou lokalizovány do středu buňky (Zapun *et al.*, 2008), kde interagují s dalšími proteiny buněčného dělení (Maggi *et al.*, 2008). PBP2b se účastní syntézy PG periferních struktur jako součást elongazomu (Morlot *et al.*, 2003). Zatímco u *S. pneumoniae* je PBP2b esenciální, u jiných ovoidních bakterií, jako jsou *S. sanguinis*, *S. thermophilus* anebo *L. lactis* esenciální není (Thibessard *et al.*, 2002; Pérez-Núñez *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Posledním PBP vyskytujícím se u *S. pneumoniae* je DD-karboxypeptidáza PBP3 (Kell *et al.*, 1993).

Jakmile je dělení buněk dokončeno, dceřiné buňky jsou od sebe odděleny PG hydrolázou LytB lokalizované pouze na pólech (Garcia *et al.*, 1999; De Las Rivas *et al.*, 2002).

Stejně jako u tyčinkovitých bakterií i u ovoidních bakterií předchází buněčnému dělení růst a prodlužování buněk syntézou periferních PG struktur. U *S. pneumoniae* byly objeveny všechny komponenty elongazomu nacházející se u *B. subtilis*, kromě MreB. Postradatelnost MreC a MreD proteinů je závislá na genetickém pozadí pneumokoka. U neopouzdrěného kmene tyto dva proteiny postradatelné jsou, jejich inaktivací nedochází k defektům v růstu ani v morfologii. U opouzdrěného kmene jsou tyto geny esenciální. Deplecí MreC nebo MreD nebo obou dojde u opouzdrěných kmenů k zastavení růstu a buňky lyzují (Land a Winkler, 2011). Součástí elongazomu *S. pneumoniae* jsou i další proteiny. PBP1a (Morlot *et al.*, 2003), GpsB (Massidda *et al.*,

1998), PBP2b (Morlot *et al.*, 2003), RodA (Fadda a Massidda, nepublikováno) a RodZ (Margolin, 2009).

### 2.6.2.1. Důležité proteiny buněčného dělení

**LocZ** je membránový protein (Nováková *et al.*, 2010), vyskytující se pouze u streptokoků, laktokoků a enterokoků (Holečková *et al.*, 2015). LocZ je substrátem Ser/Thr kinázy StkP, která ho fosforyluje na T67 a T78 *in vitro* i *in vivo* (Nováková *et al.*, 2010; Holečková *et al.*, 2015). LocZ je složen z N-terminální cytoplazmatické domény, transmembránové oblasti a C-terminální extracelulární části. Za normálních podmínek je LocZ lokalizován do středu buňky ještě před FtsZ. Jeho lokalizace není závislá na fosforylaci kinázou StkP. Odstranění *locZ* z chromozómu *S. pneumoniae* nemá vliv na životaschopnost ani dobu zdvojení, byla ale zaznamenána poněkud delší lag fáze a buňky jsou citlivější k teplotním stresům a také k oxidativnímu stresu. Deleční mutanty byly pozorovány fázovým kontrastem světelným mikroskopem a elektronovým mikroskopem. Asi 75 % těchto buněk vykazovalo několik defektů v buněčném dělení. Dělení bylo asymetrické, dceřiné buňky měly rozdílnou velikost. V populaci se nacházelo asi 4,5 % minibuněk, s délkou pod 1  $\mu\text{m}$ , které neměly DNA a vždy se párovaly s většími buňkami DNA obsahující. LocZ není esenciální pro tvorbu Z-kruhu, nicméně často bývá pozice Z-kruhu delokalizována v jeho nepřítomnosti. Získané výsledky naznačují, že LocZ je součástí mašinérie divizomu a určuje budoucí místo dělení (Holečková *et al.*, 2015).

**FtsZ** je nejvíce rozšířený esenciální protein, který je konzervovaný téměř ve všech bakteriálních druzích (Busiek a Margolin, 2015). Protein FtsZ je podobný tubulinu eukaryotních buněk (Giefing *et al.*, 2010) a je schopný specificky vázat a hydrolyzovat GTP (de Boer *et al.*, 1992).

Lokalizace a polymerizace FtsZ v buňce je nezbytná pro správné rozdělení a vytvoření identických dceřiných buněk. Také v pozdějších fázích má vliv na nasedání dalších proteinů buněčného dělení a společně tvoří dělicí mašinérii, divizom (de Boer, 2010; Lutkenhaus *et al.*, 2012; Rico *et al.*, 2013). Dělení u téměř všech bakteriálních buněk začíná polymerizací GTPázy FtsZ do kruhové struktury v místě budoucího dělení buňky (Wang a Lutkenhaus, 1993). Za spotřeby energie ve formě GTP FtsZ polymeruje ve vlákna (filamenta) (Mukherjee a Lutkenhaus, 1994), která se ukotví do membrány a vznikne tak kruhu podobný útvar známý jako Z-kruh (Erickson *et al.*, 2010). K tomu,

aby mohl být FtsZ ukotven do buněčné membrány je u *S. pneumoniae* nezbytná přítomnost FtsA proteinu (Pichoff a Lutkenhaus, 2007). Protein FtsA je podobný aktinu eukaryotních buněk (van den Ent a Löwe, 2000) a také je široce rozšířený mezi bakteriálními druhy, méně však než FtsZ (Busiek a Margolin, 2015). FtsZ protein je substrát kinázy StkP *in vitro* (Giefing *et al.*, 2010).

### Proteinu **FtsA** je věnována samostatná kapitola 2.6.3.

**DivIVA** je protein buněčného dělení, vysoce konzervovaný u G<sup>+</sup> bakterií, který má vliv na morfologii buněk a účastní se některých buněčných procesů jako je tvorba septa, segregace chromozómů a oddělování dceřiných buněk (Fadda *et al.*, 2007). Skládá se z vysoce konzervované N-terminální domény, skrz níž je DivIVA schopný vázat se do membrány a méně konzervované C-terminální domény (Oliva *et al.*, 2010). Detailněji byl prozkoumán u tyčinkovité bakterie *B. subtilis*, kde se podílí na určení středu buňky spolu s proteiny MinC a MinD, které tvoří komplex zabráňující dělení buňky na pólech. Po buněčném dělení drží DivIVA komplex MinCD u pólů buňky (Marston a Errington, 1999). U bakterií, které postrádají nebo nepotřebují MreB pro vegetativní růst jako jsou například *Streptomyces coelicolor*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Corynebacterium glutamicum*, se DivIVA účastí při biosyntéze buněčné stěny a je nezbytný pro polární růst a elongaci buněk (Letek *et al.*, 2008).

Pozorováním buněk *S. pneumoniae* fluorescenčním mikroskopem bylo zjištěno, že DivIVA je lokalizován v buněčném septu a také na pólech buňky, kde interaguje s řadou dalších proteinů také se účastnících buněčného dělení (Fadda *et al.*, 2007). Odstraněním *divIVA* se buňky zkracují a zakulacují. Buňky pneumokoka s narušeným DivIVA tvoří řetízky s nedokončenými septy a s často chybějícími jádry. To vše naznačuje, že tento protein má kontrolu nad buněčnou morfologií, dokončením buněčných sept a oddělení buněk včetně segregace chromozómů (Fadda *et al.*, 2003).

U *S. pneumoniae* byl za využití fosfoproteomové analýzy a hmotnostní spektrometrie identifikován DivIVA jako substrát kinázy StkP v *in vivo* i *in vitro* podmínkách (Nováková *et al.*, 2010). Také byl tento protein popsán jako substrát fosfatázy PhpP *in vivo* (Beilharz *et al.*, 2012) a *in vitro* (Ulrych *et al.*, 2016).

Fosforylace DivIVA a FtsZ a jejich odpovídající proteinkinázy mají nejspíše univerzální roli v regulaci cyklu buněčného dělení u G<sup>+</sup> bakterií (Nováková *et al.*, 2010). DivIVA ale neinteraguje s FtsZ ale s EzrA, který interaguje s FtsZ. FtsZ nejspíše koordinuje a organizuje periferní a septální syntézu PG skrze EzrA, GpsB a DivIVA. DivIVA spolu s GpsB nejspíš tvoří molekulární přepínač, kdy dochází ke spojení FtsZ skrz EzrA a tím k syntéze buď periferního PG pro prodlužování buněk nebo septálního PG k oddělení buněk. Spolupracují na regulaci syntézy peptidoglykanu a pozitivně ovlivňují správné rozdělení a utváření správného tvaru buňky. Nefosforylovaný DivIVA pravděpodobně stimuluje prodlužování buněk a ve fosforylovaném stavu toto prodlužování zastaví (Fleurie *et al.*, 2014).

Protein buněčného dělení **GpsB**, paralog proteinu DivIVA, je hlavním regulátorem PG biosyntézy u G<sup>+</sup> bakterií s nízkým obsahem GC párů (Massidda *et al.*, 1998). U G<sup>+</sup> tyčinkovitých bakterií, včetně *B. subtilis* a *Listeria monocytogenes*, působí jako přepínač mezi biosyntézou PG septa a periferních struktur během elongace (Claessen *et al.*, 2008; Rismondo *et al.*, 2016; Cleverley *et al.*, 2016). Přestože mají spolu s DivIVA stejnou jednu doménu, mají výrazně odlišnou funkci (Massidda *et al.*, 1998).

GspB protein je zásadní pro růst pneumokoka. Má vliv na jeho životaschopnost, velikost i tvar buněk a tvorbu septa udržením rovnováhy mezi biosyntézou PG septa a periferních struktur. Během exponenciální fáze růstu je tento protein zodpovědný za maximální stupeň fosforylace proteinů (Rued *et al.*, 2017). U *B. subtilis* je také zodpovědný za optimální fosforylaci proteinů (Pompeo *et al.*, 2015).

GspB protein je u *B. subtilis* lokalizován do oblasti divizomu, spolu s ostatními proteiny účastnicími se pozdější fáze buněčného dělení jako jsou FtsL, DivIVB, FtsW, PBP2b a DivIVA, o 20 % buněčného cyklu později oproti FtsZ, FtsA, ZapA a ErzA (Gamba *et al.*, 2009; Tavares *et al.*, 2008). U termosenzitivních  $\Delta ftsA$  mutant je jeho přítomnost v buňce nezbytná pro efektivní dělení (Tavares *et al.*, 2008) a pro lokalizaci PBP1 (Claessen *et al.*, 2008), jež reguluje prodlužovací růst vs. dělení (Morlot *et al.*, 2003).

U *B. subtilis*, *L. monocytogenes* i *S. pneumoniae* představuje GpsB dynamický protein, který osciluje mezi biosyntetickou mašinérií septa a periferních struktur a je zodpovědný za správnou funkci a lokalizaci PBP. (Claessen *et al.*, 2008; Cleverley *et al.*, 2016; Rismondo *et al.*, 2016; Rued *et al.*, 2017).

O funkci **RodA** není doposud mnoho známo. U *S. pneumoniae* je esenciální (Thanassi *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005), zatímco u *S. thermophilus* a *S. sanguinis* esenciální není (Thibessard *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2011). Nachází se v septu jako jeho homolog FtsW. RodA proteiny byly dlouho považovány za pravděpodobné flipázy, proteiny zprostředkující přenos lipidu II přes membránu. Nicméně, současná studie dokazuje, že RodA proteiny jsou PG polymerázy, které mohou funkčně nahradit PBP (Meeske *et al.*, 2016).

Poměrně málo je známo o funkci **RodZ**, který na rozdíl od ostatních proteinů elongazomu není v buňce pravidelně rozmístěn vzhledem k tvaru buňky a je přítomen u všech streptokoků (Zapun *et al.*, 2008)

### 2.6.3. FtsA

FtsA je cytoplazmatický protein buněčného dělení, široce rozšířený mezi bakteriálními druhy, podílející se na syntéze septa. Jedná se o ATP-vazebný protein (Paradis-Bleau, *et al.*, 2005), který je schopný vázat ATP *in vitro*, ale vůči nukleotidům ADP a GTP má slabou afinitu (Feucht *et al.*, 2001). U *E. coli* byla prokázána schopnost FtsA fosforylace *in vivo* (Sanchez *et al.*, 1994) a schopnost v *in vitro* podmínkách vázat ATP (Yim *et al.*, 2000) i GTP. Tyto dva nukleotidy ATP a GTP váže s větší afinitou než ADP (Lara *et al.*, 2005).

Funkcí FtsA je kotvit FtsZ do buněčné membrány, se kterým v této fázi dělení tvoří strukturu dávající základ Z-kruhu (Pichoff a Lutkenhaus, 2007). Schopnost FtsA interagovat s FtsZ i samo se sebou byla popsána u různých organismů (Wang *et al.*, 1997; Din *et al.*, 1998; Ma a Margolin, 1999) včetně *S. pneumoniae* (Yim *et al.*, 2000). U pneumokoka bylo popsáno, že FtsA v přítomnosti ATP *in vitro* interaguje s různými proteiny účastnicími se jak časně, tak pozdní fáze dělení, s FtsZ i samo se sebou. Schopnost FtsA polymerovat *in vitro* v přítomnosti ATP byla poprvé popsána u *S. pneumoniae*. *In vivo* toto zatím nebylo potvrzeno (Lara *et al.*, 2005). U *B. subtilis* bylo prokázáno, že se FtsA nachází jako dimer v *in vivo* podmínkách (Feucht *et al.*, 2001).

Poměr přítomných proteinů FtsA a FtsZ v buňce je zásadní pro buněčné dělení (Dai a Lutkenhaus, 1992). Nadprodukcí FtsA či FtsZ dochází k přerušení buněčného

dělení, které může být obnoveno zvýšením koncentrace limitovaného proteinu. Pro *E. coli* byl zjištěn vhodný poměr FtsA:FtsZ pro dělení buňky přibližně 1:100 (Wang a Gayda, 1992). U *B. subtilis* byl stanoven vhodný poměr FtsA:FtsZ 1:5 (Feucht *et al.*, 2001) a u *S. pneumoniae* 1:1,5 (Lara *et al.*, 2005).

FtsA pro *B. subtilis* esenciální není. Ale po odstranění FtsA tvoří buňky termosenzitivní filamenta s několika Z-kruhy, což vede k poruchám růstu a redukci životaschopnosti a sporulace (Beall a Lutkenhaus, 1992). FtsA je lokalizováno do dělicí oblasti po FtsZ, jehož přítomnost je nezbytná k nasednutí FtsA do dělicího kruhu během vegetativního růstu, nezávisle na DivIVB (Feucht *et al.*, 2001).

Funkce FtsA může být u *B. subtilis* částečně zastoupena proteinem SepF, který má také funkci kotvení FtsZ do membrány (Duman *et al.*, 2013) a jehož nadprodukcí je možné zčásti kompenzovat chyby vzniklé odstraněním FtsA (Ishikawa *et al.*, 2006). I přes životaschopnost mutant s odstraněným *ftsA* genem se objevují termosenzitivní mutanty, tvořící filamenta se sklonem k lýzi a chybující při sporulaci. FtsZ je u těchto buněk rozptýlené (Jensen *et al.*, 2005). Nicméně odstranění obou těchto proteinů, FtsA i SepF, je pro *B. subtilis* letální (Ishikawa *et al.*, 2006).

U *E. coli* se FtsA společně s jinými proteiny účastnicími se buněčného dělení nachází v klastru *dcw* (Ayala *et al.*, 1994), který je vysoce konzervovaný u bacilů, méně u koků (Pucci *et al.*, 1997; Massidda *et al.*, 1998). U těchto organismů je většinou umístěn před genem *ftsZ* ve směru transkripce (Nikolaichik a Donachie, 2000). FtsA je pro *E. coli* esenciální (Lutkenhaus a Donachie, 1979). U tohoto organismu se FtsA účastní v dělicím procesu od samého začátku a jeho funkcí je kotvení FtsZ do membrány (Hale a Boer, 1997). FtsA je lokalizován do středu buňky v závislosti na předchozím umístění FtsZ (Addinall a Lutkenhaus, 1996). FtsA v dalších fázích dělení je esenciální pro povolání dalších proteinů účastnících se pozdější fáze buněčného dělení FtsK, FtsQ, FtsL, FtsW, FtsI, FtsN (Addinall a lutkenhaus, 1997; Wang a Lutkenhaus, 1998; Chen a Beckwith, 2001; Pichoff a Lutkenhaus, 2002).

Protein FtsA je pro *S. pneumoniae* esenciální (Lara *et al.*, 2005). Částečná delece genu, jež ho kóduje způsobí, že septa nejsou dozavírána, buňky jsou prodloužené a tvoří filamenta. Jeho přítomnost v buňce je esenciální pro správnou lokalizaci Z-kruhu do středu buňky. FtsZ spolu s FtsA jsou lokalizovány do středu buňky. Fluorescenční mikroskopii bylo ukázáno, že oba tyto proteiny spolu kolokalizují ve všech fázích dělení.

Nadprodukce FtsA nezpůsobí morfologické změny, ale se zvyšujícím se množstvím FtsA dochází ke zrychlování procesů tvorby septa (Mura *et al.*, 2016). FtsA je substrátem kinázy StkP *in vitro* (Beilharz *et al.*, 2012).

#### 2.6.3.1.1 Struktura

Struktura FtsA je podobná skupině proteinů, které mají rozdílnou funkci, ale podobnou 3-D strukturu a patří do proteinové nadrodiny aktin/Hsp70/hexokináz (Bork *et al.*, 1992; Hurley, 1996). Proteiny patřící do této skupiny proteinů vážou a hydrolyzují ATP (Pollard, 1990). Krystalovou strukturou FtsA z bakterie *Thermotoga maritima* bylo zjištěno, že FtsA se nejvíce podobá svojí strukturou aktinu (van den Ent a Löwe, 2000), jehož ATPázová aktivita je zapojena v kontrole polymerizace (Pollard, 1990). U hexokinázy je hydrolýza ATP spojena s fosforylací glukózy na začátku glykolýzy (Middleton, 1990) a u Hsp70 s různými funkcemi šaperoninů (Gething a Sambrook, 1992).

Tato skupina proteinů má podobnou 3-D strukturu, vyznačující se přítomností dvou domén (I a II) o podobné konformaci s oblastí vázající ATP. Každá tato doména je složena ze dvou subdomén (Ia, Ib, Iia, Iib). Subdomény Ia a Iia jsou prostorově symetricky uspořádány, mají stejnou sekundární strukturu a propojení smyček (Flaherty *et al.*, 1990; Kabsch *et al.*, 1990; Flaherty *et al.*, 1991).

Struktura FtsA se ale od aktinu a od jiných bakteriálních aktinu podobných proteinů liší tím, že FtsA postrádá subdoménu Ib. Místo ní se na opačné straně molekuly nachází doména Ic, která je zodpovědná za jeho specifickou funkci (van den Ent a Löwe, 2000), intarekci s pozdními proteiny buněčného dělení v oblasti tvořícího se septa. U *E. coli* je doména Ic esenciální pro buněčné dělení (Rico *et al.*, 2004; Corbin *et al.*, 2004). Zkrácením FtsA o doménu Ic nebo Iib (konkrétně  $\beta$ -řetězec S12 a S13) je u *S. pneumoniae* inhibována ATP dependentní polymerizace (Krupka *et al.*, 2012).

Pro vazbu FtsA na FtsZ je nezbytná přítomnost konzervovaných sekvencí na C-terminálním konci proteinu (Wang *et al.*, 1997). C-terminální část FtsA je důležitá pro biologickou aktivitu proteinu. Bylo testováno 27 residuí na C-terminálním konci FtsA a bylo zjištěno, že odstraněním pěti a více residuí vznikají nefunkční proteiny *in vivo* (Yim *et al.*, 2000).

Na základě studie krystalové struktury FtsA bylo také ukázáno, že FtsA polymerizuje v přítomnosti lipidové povrchové vrstvy a tvoří aktinu podobná

protofilamenta (Szwedziak *et al.*, 2012). Polymerizace FtsA je důležitá pro jeho funkci *in vivo* (Pichoff a Lutkenhaus, 2005, Pichoff *et al.*, 2012). Pro regulaci polymerizace a ukotvení FtsA do membrány jsou u *E. coli* esenciální sekvence MTS („membrane targeting sequence), nacházející se na C-terminálním konci molekuly, tvořené konzervovaným amfipatickým helixem (Pichoff a Lutkenhaus, 2005; Yim *et al.*, 2000). U *S. pneumoniae* bylo zjištěno, že odstraněním posledních 52 aminokyselinových zbytků z C-terminálního konce FtsA polymerují v *in vitro* podmínkách tyto proteiny rychleji oproti celému proteinu FtsA (Krupka *et al.*, 2014).

## **2.7. Regulace buněčného dělení prostřednictvím Ser/Thr proteinkináz**

Prokaryotní buňky k přenosu signálu užívají reverzibilní proces proteinovou fosforylací, která je katalyzována proteinovými kinázami a fosfatázami. Během procesu fosforylace dochází k přenosu fosfátové skupiny na cílový protein, který má být modifikován. Fosforylová skupina je z aktivní autofosforylované kinázy přenesena na hydroxylovou skupinu aminokyselinového zbytku cíleného proteinu (Oliver *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že fosfátová skupina se vyznačuje vysokou hustotou náboje, schopností tvořit více vodíkových můstků a také vysokým sklonem k tvorbě silných solných můstků s argininem, může měnit funkční vlastnosti bílkovin, např. konformaci nebo interakci s jinými proteiny (Johnson a Barford, 1993). U bakterií se vyskytuje fosforylace proteinů na histidinovém, aspartátovém, cysteinovém, argininovém, serinovém, treoninovém a i tyrosinovém aminokyselinovém zbytku (Shi a Zhang, 2004; Wehenkel *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2011; Standish a Morona, 2014).

Nejrozšířenějším typem bakteriálního přenosu signálu jsou dvoukomponentové systémy (TCS - two components systems), složené z histidinové kinázy a jejího odpovídajícího regulátoru (Stock *et al.*, 2000). Různé druhy bakterií ale disponují také Ser/Thr proteinkinázami (eSTKs - eukaryotic-like serine and threonine kinases) a Ser/Thr fosfatázami eukaryotického typu (eSTPs – eukaryotic-like serin and threonin phosphatases), které regulují různé procesy v buňce (Pereira *et al.*, 2011).

### **2.7.1. Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs)**

Dříve se myslelo, že proteinová fosforylace na serinových, treoninových a tyrosinových aminokyselinových zbytcích se vyskytuje výhradně u buněk



eukaryotického typu. Nicméně se ukázalo, že k těmto fosforylacím dochází také u buněk prokaryotických. To bylo potvrzeno objevením bakteriální eSTKs u půdní bakterie *Myxococcus xanthus* (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). Nyní už je zřejmé, že geny Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu jsou hojně rozšířeny u bakterií a že regulují nejrůznější buněčné procesy. Substráty fosforylované za účasti eSTKs mají nezastupitelnou roli v různých buněčných procesech od biosyntézy buněčné stěny přes buněčné dělení a diferenciaci až po primární či sekundární metabolismus, případně regulují virulenci u některých patogenů, např. *Streptococcus agalactiae* (Rajagopal *et al.*, 2003) nebo *Mycobacterium Tuberculosis* (Chawla *et al.*, 2014).

Příkladem eSTKs je PrkC, který ovlivňuje sporulaci a klíčení spor u *B. subtilis* (Shah *et al.*, 2008) nebo AfsK regulující růst hyf u *Streptomyces coelicolor* (Hempel *et al.*, 2012). PrkC *Enterococcus faecalis* odpovídá za antimikrobiální odolnost (Kristich *et al.*, 2007). U enterokoků a streptokoků jsou eSTKs a eSTPs důležité pro správnou formaci a umístění septa a oddělení buněk, umožněné skrz fosforylaci důležitých proteinů buněčného dělení (Pereira *et al.*, 2011). Proteinkináza Stk1 *S. agalactiae* a její fosfatáza Stp1 regulují růst, stresové odpovědi, virulenci a i buněčné opravy (Rajagopal *et al.*, 2003). U *S. mutans* kináza PknB s její fosfatázou PppL regulují buněčné dělení, vývoj a formaci buněčného jádra, kompetenci, odolnost vůči stresům, tvorbu biofilmu a produkci bakteriocinů (Hussain *et al.*, 2006; Banu *et al.*, 2010). V genomu *M. tuberculosis* je kódováno 11 domělých eSTKPs (Cole *et al.*, 1998) hrajících roli v různých buněčných procesech. Např. kinázy PknA a PknB jsou zodpovědné za morfologii a tvar buňky (Kang *et al.*, 2005). PknB působí také jako přepínač, jehož aktivita reaktivuje buňky z hypoxického stavu (Ortega *et al.*, 2014). Za virulenci, adaptaci a růst uvnitř hostitele odpovídají kinázy PknG a PknH (Cowley *et al.*, 2004; Walburger *et al.*, 2004). A kináza PknF reguluje buněčné dělení, růstovou rychlost, morfologii a transport glukózy (Deol *et al.*, 2005). Některé proteinkinázy eukaryotického typu interagují s TCS. Např. Stk1 *S. aureus* je schopna fosforylovat odpovídající regulátor TCS GraSR a také VraR z trojkomponentového signál přenášejícího systému (Falord *et al.*, 2011). *E. coli* ve svém genomu neobsahuje žádné eSTKs geny (Galperin *et al.*, 2010).

V současnosti je modelový vzor eSTKs založen na části struktury kinázy PknB *Mycobacterium tuberculosis*, příbuzné k eukaryotickým kinázám Hanksova typu (Young *et al.*, 2003).

Proteinkinázy eSTKs se nachází buď v cytoplazmatické frakci jako cytoplazmatické enzymy anebo plní funkci transmembránových enzymů. Extracelulární část těchto transmembránových proteinů tvoří jedna či více senzorických domén. Vazba signální molekuly na jednu ze senzorických domén způsobí konformační změny, po kterých následuje autofosforylace intracelulární katalytické domény, která následně fosforyluje příslušný substrát, který je součástí signální dráhy (Barthe *et al.*, 2010).

#### 2.7.1.1. PASTA domény

V genomu G<sup>+</sup> bakterií je kódován vysoce konzervovaný signalizační systém eukaryotického typu složený ze Ser/Thr proteinkinázy a fosfatázy typu PP2C hrající důležitou roli v růstu a dělení buněk. Proteinkináza je složena z cytoplazmatické kinázové domény, transmembránové oblasti a extracelulární C-terminální části skládající se ze tří nebo čtyř PASTA („Penicillim-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated“) domén poprvé identifikovaných u PBP2x proteinu u *S. pneumoniae*. Bylo ukázáno, že PASTA domény mohou vázat fragmenty PG, které by mohly sloužit jako signální molekuly (Yeats *et al.*, 2002). To bylo potvrzeno, když byly objeveny PASTA domény kinázy PrkC u *B. subtilis*, která je schopna vázat PG *in vitro*. Jejím aktivačním signálem *in vivo* jsou muropeptidy odvozené od buněčné stěny, po jejichž navázání na PrkC dojde k aktivaci klíčení spor (Shah *et al.*, 2008).

PASTA domény jsou tvořeny repetitivy obsahujícími asi 70 aminokyselinových zbytků. Konzervovaná oblast se může vyskytovat buď samostatně, nebo v několika kopiích. PASTA se nachází u penicilin vázajících proteinů (PBPs) a u eSTKs (Yeats *et al.*, 2002). Dle sekvenčního srovnání jsou v jednotlivých proteinech PASTA domény velmi proměnlivé a nejspíše se vyvinuly tak, aby měli vazebnou afinitu ke specifickým kmenům peptidových ligandů (Jones a Dyson, 2006). U eukaryot tyto domény zatím objeveny nebyly, nicméně u archeabakterií byly PASTA domény identifikovány jako součást některých hypotetických proteinů a peptidyl-prolyl izomerázy (Yeats *et al.*, 2002).

Současný trend, přibývání multirezistentních kmenů bakterií k antibiotikům, volá po nějaké alternativě léčby. Určitou nadějí by mohly být specifické inhibitory blokující činnost eSTKs, jelikož jejich substrátové proteiny mají zásadní vliv na buněčné procesy včetně dělení či biosyntézy buněčné stěny. Přídavné PASTA domény eSTKs by mohly být řešením, možnou alternativou nové léčby. PASTA domény se nevyskytují

u eukaryotických buněk a jejich umístění v extracelulárním prostoru z nich dělá snadnější cíl (Nováková *et al.*, 2010).

### 2.7.2. Přenos signálů *S. pneumoniae*

Komunikace *S. pneumoniae* s okolním prostředím je zprostředkovávána jako u jiných bakterií pomocí dvoukomponentových systémů (TCS), složených z histidinové proteinkinázy a odpovídajícího regulátoru (Jung *et al.*, 2012). Navíc je ale u pneumokoka přenos signálu umožněn také pomocí signalizační sítě Ser/Thr proteinkinázy StkP (eSTKs) a fosfatázy PhpP (eSTPs) eukaryotického typu. Tento systém funguje podobně jako TCS, ale je na nich zcela nezávislý (Madec *et al.*, 2002).

V genomu *Streptococcus pneumoniae* je kódována pouze jediná kopie genu pro Ser/Thr proteinkinázu (*stkP*) a Ser/Thr proteinfosfázu (*phpP*) eukaryotického typu, proto je *S. pneumoniae* vhodným modelovým organizmem pro studování Ser/Thr fosforylace u prokaryot (Echenique *et al.*, 2004). Tyto dva geny jsou součástí jednoho operonu, kde se překrývají čtyřmi páry bází (Nováková *et al.*, 2005) a hrají důležitou roli v regulaci syntézy buněčné stěny během růstu a dělení buněk u *S. pneumoniae* a zajišťující jim jejich oválný tvar (Beilharz *et al.*, 2012).

#### 2.7.2.1. StkP proteinkináza

Proteinkináza StkP je transmembránový  $Mn^{2+}$  a  $Mg^{2+}$  - dependentní protein, schopný autofosforylace, který je složen ze tří funkčně oddělených domén: N-terminální cytoplazmatické intracelulární kinázové domény, hydrofobní transmembránové domény a C-terminální extracelulární senzorické domény se čtyřikrát opakujícími se PASTA repetitivy, které jsou důležité pro aktivaci a fosforylaci StkP *in vitro* (Nováková *et al.*, 2005, Pallová *et al.*, 2007). Kinázová aktivita a lokalizace StkP do oblasti septa závisí na přítomnosti cytoplazmatické kinázové domény a extracelulárních PASTA domén (Beilharz *et al.*, 2012).

U *S. pneumoniae* se vyskytuje StkP v *in vivo* podmínkách jako dimer. K dimerizaci dochází mezi transmembránovou oblastí a C-terminální PASTA doménou *in vivo* a i *in vitro*. Tato konformace je klíčová pro enzymatickou aktivitu proteinu, díky které jsou dvě kinázové domény v těsné blízkosti a následující transfosforylací dojde ke konformačním změnám kinázy a rozpoznání substrátu. Bez transmembránové domény je StkP nefunkční, z důvodu neschopnosti tvořit dimer s jiným monomermem. Přítomnost

kinázy StkP je v buňce nezbytná pro fosforylaci na Thr aminokyselinových zbytcích. Dle srovnání proteomů divokého kmene a kmene s delecí *stkP* bylo zjištěno, že fosforylace na Ser zbytcích je na přítomnosti kinázy převážně nezávislá (Pallová *et al.*, 2007; Nováková *et al.*, 2010).

Pro aktivitu StkP, fosforylaci substrátů a lokalizaci v buněčném septu jsou u *S. pneumoniae* esenciální C-terminální PASTA domény kinázy StkP (Nováková *et al.*, 2010), které jsou schopné vázat volný PG odvozený od *S. pneumoniae*, zatímco reakce s muropeptidy PG *S. aureus* se prokázat nepodařilo (Maestro *et al.*, 2011). PASTA domény *S. pneumoniae* specificky rozpoznají volný PG, který na třetí pozici peptidového řetězce obsahuje L-lysin a poté jsou schopné zacílit StkP do oblasti dělení (Beilharz *et al.*, 2012).

Aktivačním signálem StkP autofosforylace *in vivo* podmínkách jsou pravděpodobně volné podjednotky peptidoglykanu, hlavně NAG/NAM-pp, který je nejvíce přítomen v rostoucích buňkách. Aktivita StkP zůstává konstantní v průběhu celého růstu buňky a je pak inhibována zastavením růstu. Přítomnost antibiotika ampicilinu, který se váže na transpeptidázovou a karboxypeptidázovou doménu PBP, čímž blokuje spojení PG, může způsobit zvýšení aktivity StkP. Naopak antibiotikem vankomycinem, který se váže na C-terminální zbytek D-Ala-D-Ala peptidového řetězce peptidoglykanové podjednotky, sloužící jako ligandy pro PASTA domény StkP a tím naruší aktivitu StkP, lze aktivitu StkP snížit (Beilharz *et al.*, 2012). Během nedostatku glukózy, v době, kdy buňka hladoví, dochází k výraznému poklesu fosforylace na Thr reziduích (Nováková *et al.*, 2010).

Po inaktivaci genu *stkP* je pneumokok životaschopný. StkP není pro buňku esenciální (Sasková *et al.*, 2007). Deleční kmen  $\Delta stkP$  pozorovaný pod elektronovým mikroskopem má atypicky prodloužený tvar buněk s poruchou buněčného dělení (Giefing *et al.*, 2010), což je podmíněno přítomností několika FtsZ kruhů u elongujících buněk. Buňka může zahájit dělení, ale neví, kdy a kde má začít. V těchto buňkách převažují elongační procesy nad dělicími (Beilharz *et al.*, 2012). Buňky bez StkP hůře reagují na různé stresové podmínky, např. špatně se vyrovnávají se zvýšenou teplotou, nízkým pH, vlivem oxidačních činidel aj. (Sasková *et al.*, 2007). StkP má také zásadní vliv na důležité buněčné procesy (Giefing *et al.*, 2010) jako je biosyntéza buněčné stěny a kontrola správného utváření a uzavření septa (Beilharz *et al.*, 2012). U virulentních kmenů je StkP zásadní pro infikování plic a proniknutí bakterie do krevního řečiště. Dále má StkP vliv

na kompetenci nevirulentních kmenů, pozitivní aktivaci *comCDE* operonu, kódujícího geny účastníci se kompetence (Echenique *et al.*, 2004). Také má StkP pozitivní vliv na transkripci některých genů, třeba genů účastnících se biosyntézy buněčné stěny či pyrimidinu nebo genů regulujících odpověď oxidativního stresu nebo genů majících vliv na opravy DNA (Sasková *et al.*, 2007).

Konzervovaný protein StkP, vyskytující se ve všech klinických izolátech *S. pneumoniae*, představuje velmi dobrý imunogenní antigen. Díky tomu byla kináza StkP vybrána za potenciální cíl pro vývoj nové vakcíny (Giefing *et al.*, 2010).

#### 2.7.2.1.1 Identifikované substráty kinázy StkP *S. pneumoniae*

Dříve se k detekci pravděpodobných substrátů StkP *in vivo* užívalo značení <sup>33</sup>P-ortofosfátem. Tato metoda má značné nedostatky jako například kultivace musí probíhat na specifických růstových médiích a jsou identifikovány proteiny fosforylované pouze během značení. Proto se začala k identifikaci substrátů StkP používat imunodetekce se specifickými protilátkami: fosfotreoninové (anti-P-Thr) a fosfoserinové (Nováková *et al.*, 2010).

Zatím bylo identifikováno deset substrátů proteinkinázy StkP vyskytujících se jak v cytoplasmě, tak v cytoplazmatické membráně. Jedná se o proteiny buněčného dělení **DivIVA**, **Spr0334** (LocZ), (Nováková *et al.*, 2010), **FtsA** (Beilharz *et al.*, 2012) a **FtsZ** (Giefing *et al.*, 2010), regulátory transkripce **RitR** (Ulijasz *et al.*, 2009) a **RR06** (Agarwal *et al.*, 2012), anorganickou pyrofosfatázu **PpaC** (Nováková *et al.*, 2010), enzymy biosyntézy buněčné stěny **MurC** (Falk a Weisblum, 2013) a **GlmM** (Nováková *et al.*, 2005) a RNA vázající protein **Jag** (Ulrych *et al.*, 2016).

Některé identifikované substráty kinázy StkP se účastní metabolismu buněčné stěny a buněčného dělení. Například fosfoglukozaminmutáza GlmM nebo dělicí protein DivIVA, FtsZ a FtsA či prekursor biosyntézy PG MurC (Nováková *et al.*, 2005; Osaki *et al.*, 2009; Giefing *et al.*, 2010; Nováková *et al.*, 2010; Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012; Falk a Weisblum, 2013).

Bioinformatickou analýzou genomové sekvence *S. pneumoniae* byl protein **RitR** („Repressor of iron transport - represor transportu železa), (Ulijasz *et al.*, 2004) identifikován jako nespárovaný transkripční regulátor TCS (Throup *et al.*, 2000), který reprimuje příjem železa v *in vitro* podmínkách (Ulijasz *et al.*, 2004). RitR má vliv na virulenci *S. pneumoniae*. Odstranění genu *ritR* způsobí snížení virulence (Throup *et al.*,

2000) a také zvýšení exprese genů účastnících se příjmu komplexu Fe-hem (Ulijasz *et al.*, 2004).

Tento regulátor je složen z C-terminální DNA vazebné domény a N-terminální regulační domény. V regulační doméně, na předpokládané pozici pro fosforylaci His-kinázou TCS, byla detekována místa předpokládané fosforylace na aspartátovém a asparaginovém zbytku. V DNA vazebné doméně proteinu RitR je místo fosforylované StkP kinázou. Bylo prokázáno, že RitR je substrátem kinázy StkP *in vitro*. V chromozómu *S. pneumoniae* se nachází operon *piuABC* kódující proteiny zapojené v příjmu železa. Tento operon je regulován promotorem *piu*, se kterým interaguje fosforylovaný protein RitR, jehož navázáním dojde k potlačení exprese genů tohoto operonu (Ulijasz *et al.*, 2009).

*S. pneumoniae* disponuje 13 identifikovanými TCSs. Jením z nich je i TCS06, jehož odpovědným regulátorem odpovědi His kinázy HK06 je právě protein **RR06** (Throup *et al.*, 2000; Standish *et al.*, 2005), který je fosforylován v *in vitro* i v *in vivo* podmínkách kinázou StkP na Thr zbytcích, a to nezávisle na HK06. Takto postranslačně modifikovaný RR06 se váže s vysokou účinností na promotor genu *cbpA* (Agarwal *et al.*, 2012), kde působí jako transkripční aktivátor tohoto genu, jehož přepisem dojde k expresi jednoho z cholin vazebných proteinů, známého též jako PspC, představující povrchový adhezin, jeden z mnoha virulenčních faktorů *S. pneumoniae* (Standish *et al.*, 2005). Fosforylovaný RR06 je substrátem fosfatázy PhpP, která má opačný, defosforylační účinek vůči proteinu, což nasvědčuje tomu, že je exprese genu *cbpA* přímo regulována signalizačním párem Stkp/PhpP (Agarwal *et al.*, 2012). Vliv RR06 na virulenci *S. pneumoniae* potvrdil i další výzkum, ve kterém bylo prokázáno, že RR06 reguluje expresi genu *pspA*, který kóduje další virulenční cholin vazebný protein (Standish *et al.*, 2007).

Ligáza **MurC** (UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanine ligáse) je enzym syntetizující esenciální meziprodukt biosyntézy peptidoglykanu buněčné stěny. Katalyzuje reakci, během které se nukleotidový prekurzor PG (UDP-N-acetylmuramová kyselina) naváže na první L-alanin aminokyselinový zbytek. MurC je substrátem kinázy StkP a stejně tak i fosforylovaný MurC je substrátem fosfatázy PhpP *in vitro* (Falk a Weisblum, 2013).

Srovnáním 2D fosfoproteomových map divokého a mutantního  $\Delta\text{stkP}$  kmene byl odhalen substrát kinázy StkP fosfoglukosaminmutáza **GlmM** (Nováková *et al.*, 2005). GlmM se účastní biosyntetické dráhy vzniku UDP-N-acetylglukosaminu, což je esenciální prekurzor peptidoglykanu, lipopolysacharidu a teichoových kyselin. V buňkách *E. coli* je GlmM syntetizováno v neaktivním defosforylovaném stavu (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Aby byl protein aktivní musí být fosforylován. GlmM jako substrát StkP, katalyzuje první krok biosyntetické dráhy, kdy dochází k přeměně glukosamin-6-fosfátu na glukosamin-1-fosfát (Nováková *et al.*, 2005).

Rozpusťný enzym **PpaC** je na manganatých iontech závislá pyrofosfatáza, nejvíce prozkoumána u *S. agalactiae*, u kterého hraje roli ve virulenci (Rajagopal *et al.*, 2006). U tohoto mikroorganismu je fosforylován kinázou Stk1 na serinových reziduích (Silvestroni *et al.*, 2009). Jedná se o esenciální enzym katalyzující hydrolýzu anorganického pyrofosfátu (PPi). PPi je důležitou součástí metabolismu uhlíku, hydrolýzy ATP a účastní se biosyntézy aminokyselin a nukleotidů. Většinou účinkuje jako inhibitor (Lahti, 1983). Sekvenční analýza proteinu PpaC u *S. agalactiae* a *S. pneumoniae* ukázala jejich 85% podobnost. U pneumokoka je v podmínkách *in vivo* fosforylace PapC na treoninovém zbytku závislá na StkP kináze (Silvestroni *et al.*, 2009). Nicméně v podmínkách *in vitro* se toto potvrdit nepodařilo, což vede k hypotéze, že k jeho fosforylaci *in vivo* je třeba spolupráce jiného proteinu nebo specifických reakčních podmínek (Nováková *et al.*, 2010).

**Jag** protein s hypotetickou funkcí obsahuje 3 domény: N-terminální Jag\_N doménu - řetězec 50 aminokyselin s neznámou funkcí; KH doménu – doména vázající RNA a poslední R3H doménu – její motiv se vyskytuje napříč všemi říšemi a váže ssDNA a ssRNA. Homology Jag proteinu jsou konzervované hlavně u rodu *Firmicutes*. Složení jejich domén napovídá, že se jedná o RNA vázající proteiny, ale jejich funkce je zatím neznámá (Ulrych *et al.*, 2016). Známý je jeden fosforylační zbytek na Thr89 závislý na kináze StkP (Sun *et al.*, 2010), který je fosforylován *in vivo*. Druhé místo fosforylace zatím nebylo identifikováno. Za defosforylaci proteinu je zodpovědná fosfatáza PhpP (Ulrych *et al.*, 2016).

Kmeny  $\Delta jag$  kultivované v TSB médiu mají ve srovnání s divokým kmenem o 3 minuty delší dobu zdvojení, lag fázi mají podstatně delší a stacionární fáze dosahují při nižší optické denzitě. Buňky  $\Delta jag$  jsou menší, což naznačuje, že Jag protein hraje roli v buněčném dělení (Ulrych *et al.*, 2016). To bylo nyní potvrzeno v nové studii, která prokázala, že mutace v *jag* genu (nazvaný nově *eloR*) v KH a R3H doménách, způsobuje vznik supresorových mutací v genech kódujících proteiny RodA, PBP2b, RodZ a MreC, které jsou všechny součástí elongazomu (Stamsås *et al.*, 2017).

#### 2.7.2.2. PhpP fosfatáza

Rodina PP2C, do níž fosfatáza PhpP patří, se vyznačuje rezistencí vůči okadaiové kyselině, která inhibuje funkci jiných rodin fosfatáz PP2A a PP2B (MacKintosh a MacKintosh, 1994). Pro funkci eukaryotických fosfatáz PP2C je esenciální přítomnost konzervovaných aspartátových zbytků D192 a D231 (Das *et al.*, 1996). O několik let později byla prokázána nezbytná přítomnost těchto aspartátových reziduí D192 a D231 také pro bakteriální PP2C fosfatázovou aktivitu *in vitro* (Nováková *et al.*, 2005) a pro lokalizaci PhpP v dělicím aparátu buňky spolu s ostatními proteiny buněčného dělení (Ulrych *et al.*, 2016).

Fosfatáza PhpP je cytoplazmatický protein (Pallová *et al.*, 2007), jehož funkcí je defosfoylace StkP a jejích substrátů na Thr reziduích. Ke své aktivitě potřebuje přítomnost manganatých iontů. Nejvyšší aktivity dosahuje purifikovaný protein při koncentraci  $Mg^{2+}$  0,5-1 mM. PhpP není pro buňku esenciální. Má opačnou funkci k StkP, negativně ovlivňuje fosforylaci v buňce. V  $\Delta phpP$  mutantách dochází ke zvýšení autofosforylace StkP a její substráty jsou hyperfosforylovány. Fenotypem se  $\Delta phpP$  kmeny podobají mutantním kmenům s nadprodukovanou StkP, kde dochází ke zmenšování buněk možná vlivem nedostatečného prodlužování buněk nebo nedostatečnou konstrikcí Z-kruhu. Při nadprodukci PhpP dojde k defosforylaci StkP i jejích substrátů a fenotypem se buňky podobají kmenům  $\Delta stkP$ . Buňky jsou delší a obsahují vícečetná buněčná septa (Ulrych *et al.*, 2016).

StkP spolu s fosfatázou PhpP tvoří funkční signalizační pár s protichůdnou rolí v regulaci. Autofosforylovaná StkP je endogenním substrátem pro PhpP stejně jako fosforylované substráty StkP kinázy. Není vyloučeno, že fosfatáza PhpP by mohla mít širší spektrum substrátů, než jsou StkP substráty. Je předpokládáno, že StkP a PhpP skrze fosforylaci několika substrátů společně regulují přesun proteinů buněčného dělení



z buněčných okrajových oblastí do oblasti syntézy septa (Nováková *et al.*, 2005; Ulrych *et al.*, 2016).

Pro lokalizaci PhpP do oblasti dělení je nezbytná přítomnost aktivní StkP. V kmenech bez StkP je PhpP lokalizováno v cytoplazmě. S přibližující se stacionární fází množství PhpP v buňce signifikantně klesá. (Beilharz *et al.*, 2012).

## **2.8. Fosfoproteom – separační a obohacovací techniky**

Jednou z možností postranlačních modifikací proteinů je reverzibilní proces fosforylace, který hraje klíčovou úlohu v mnoha různých buněčných procesech včetně regulace buněčného cyklu a přenosech signálů (Garnak a Revers, 1979; Moll *et al.*, 1991). Během fosforylace dochází ke kovalentnímu připojení fosfátové skupiny na příslušnou aminokyselinu. Nejčastěji dochází k fosforylacím na serinovém, treoninovém nebo tyrosinovém aminokyselinovém zbytku bílkoviny. Identifikace fosforylovaných proteinů prostřednictvím hmotnostní spektrometrie (MS) je nezbytná pro rekonstrukci signálních drah kontrolovaných odpovědnými proteinkinázami. Pro separaci fosforylovaných proteinů se využívají dva metodické přístupy. Gelová technika, kdy dochází k separaci bílkovin v gelové matici nebo negelová technika, kde matici tvoří jiný nosič – kapalina (např. kapalinová chromatografie). Takto separované bílkoviny lze následně identifikovat pomocí MS.

Proces fosforylace je v buňce přechodný a proteiny jsou přítomny jak ve fosforylované, tak v nefosforylované formě. Navíc fosforylační modifikované proteiny jsou v daném okamžiku v buňce přítomny v daleko menším zastoupení oproti jejich nativní formě, což má za následek, že se ztrácejí mezi více zastoupenými proteiny. To má vliv na přímou MS analýzu, kde v důsledku nízkého zastoupení fosforylovaných proteinů může docházet k tzv. iontové supresi – ionizace méně zastoupených fosforylovaných proteinů je méně účinná oproti ionizaci více zastoupených nefosforylovaných proteinů z důvodu přítomnosti většího množství proteinů v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru (Marcantonio *et al.*, 2008). Z tohoto důvodu se před samotnou MS analýzou používají různé obohacovací a frakcionační metody, které odstraní nefosforylované proteiny ze vzorku a tím zvýší počet fosfoproteinů, které mohou být identifikovány. Obohacování může probíhat buď na úrovni fosfoproteinů nebo fosfopeptidů. Tyto dva přístupy se prolínají. Mnohé obohacovací metody se používají pro obě strategie. Také mohou být tyto dva přístupy kombinovány. Což spočívá v obohacení o fosfoproteiny,

které jsou pak separovány a následně štěpeny na peptidy, které jsou poté také ještě obohaceny o fosfopeptidy. Tohoto způsobu se může využívat i v kombinaci s dalšími metodami, např. metoda izotopového značení fosfoproteinů (Ito *et al.*, 2009).

### 2.8.1. Gelové metody separace fosfoproteinů

Obohacené frakce fosfobílkovin mohou být za účelem MS identifikace nejprve separovány v gelu pomocí 1-D či 2-D SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).

Pomocí 2-DE gelu (záleží na velikosti použitého gelu) lze velmi dobře detekovat přes 10 000 spotů korespondujících asi s 1000 proteinů (Gorg *et al.*, 2009). Velkou výhodou 2-DE zůstává dělení jednotlivých izoform proteinů. Na výsledném elektroforetogramu jednotlivé spoty většinou korespondují s jedním proteinem. Nedostatečným rozdělením proteinů v gelu mohou vznikat překryvy jednotlivých proteinových spotů a tím znesnadnit MALDI identifikaci (Gygi *et al.*, 2000).

Důležitým faktorem analýzy 2-DE obrazu je detekce separovaných bílkovin. Velkému pokroku v reprodukovatelnosti výsledků přispělo zavedení fluorescenčních barev, respektive tzv. DIGE barvení (Diferent In Gel Electrophoresis). Tato technika, využívající 3 typů fluorescenčních barviv použitých v jednom gelu (Cy3 a Cy5 – pro barvení srovnávaných vzorků a Cy2 – interní standard) (Unlü *et al.* 1997), výrazně zlepšila kvantitativní přesnost 2-DE. Také mohou být fosfoproteiny v polyakrylamidovém gelu fluorescenčně značeny pomocí soupravy Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (ThermoFischer Scientific) nebo použitím Phos-Tag<sup>TM</sup> Phosphoprotein Gel stain Kit (GeneCopoeia<sup>TM</sup>). Nicméně pro následnou identifikaci pomocí MALDI TOF analýzy je stále podstatné, aby proteiny byly následně obarvitelné a viditelné na gelu i pomocí koloidní Coomassie blue, která má detekční limit v rozmezí 10-30 ng, na rozdíl od fluorescenčních značek, kde se detekce pohybuje mezi 4-8 ng (Deep Purple, GE Healthcare), nebo mezi 1-2 ng (Sypro Ruby, Molecular Probes). Některé geny, jako třeba transkripční faktory, mají nízký počet kopií genových produktů, a tudíž je není možné tímto způsobem cíleně detekovat (Gygi *et al.*, 2000).

Jednotlivé separované proteiny jsou izolovány z gelu a štěpeny specifickou proteázou (nejčastěji používaný je trypsin). Z proteinového spotu je pomocí MS získáno spektrum peptidů, které s největší pravděpodobností patří jednomu proteinu (Yates *et al.*, 1993). Po štěpení specifickými proteázami nemusí být peptidy ihned identifikovány.

Mohou být nejdříve separovány chromatografickými metodami, s následným znovuobohacením, tentokrát na úrovni peptidů a teprve poté podrobeny MS analýze. (Wessel a Flüggé, 1984; Zhou *et al.*, 2005; Bodenmiller *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2009).

Technika 2-DE má bohužel i celou řadu nevýhod, např. hydrofobní proteiny mohou být nedostatečně resuspendovány a následně separovány. Stejný problém mají i extrémně malé, kyselé nebo zásadité proteiny (Barry *et al.*, 2003). Během přípravy a separace vzorků na 2-DE také dochází k velkým ztrátám bílkovin, v některých případech může dosahovat až 80 % proteinů (Zhou *et al.* 2005), což opět komplikuje zachycení méně zastoupených proteinů. Další nevýhodou při následné kvantifikaci zůstává fakt, že dva proteiny kódované jedním genem mohou migrovat v odlišné lokaci v důsledku postranlačných úprav proteinů.

Mnoho z těchto nevýhod, lze vylepšit cílenými modifikacemi metody v závislosti na konkrétním vzorku a situaci. Nicméně cílené úpravy metod jsou časově náročné a ne příliš spolehlivé. Proto byly vyvinuty i jiné techniky separace - tzv. negelové metody, kde dochází k separaci v kapalně fázi.

### **2.8.2. Negelové metody separace fosfopeptidů**

Proteinové vzorky jsou většinou velmi komplexní a je nutné pro zachycení co nejvíce změn tuto komplexnost snížit a vzorek rozdělit do více frakcí – prefrakcionace vzorku. Velmi složité vzorky jsou třeba vzorky tkání, kde se využívá k extrakci několika kroků. Příkladem je extrakce proteinů z pylu *Arabidopsis thaliana*, jejímž výsledkem jsou tři proteinové subfrakce - cytosolická, membránová a proteiny buněčné stěny (Holmes-Davis *et al.*, 2005). Proteiny se nejčastěji prefrakcionují použitím kapalinové chromatografie patřící mezi kapilární elektromigrační metody, souhrnně označované jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE – high-performance capillary electrophoresis), která vynahrazuje nedostatky 2-DE. Lze tak identifikovat i proteiny méně zastoupené, s extrémním izoelektrickým bodem nebo s extrémní molekulovou hmotností. Jsou to velmi účinné a citlivé separační metody založené na dělení látek v elektrickém poli. Proud je veden v kapiláře, která je naplněna elektrolytem. Celý buněčný lyzát nebo homogenizovaná tkáň jsou enzymaticky štěpeny na peptidy a následně separovány mikrokapilární kapalnou chromatografií (LC – liquid chromatography). Separované peptidy jsou poté ionizovány elektrosprejem a peptidy analyzovány MS (Horvath *et al.*, 1967; Alpert, 1990; Wilkins *et al.*, 2007).

Kapalinová chromatografie s následnou MS bývá využita ve spojení s metodami kvantifikace proteinů izotopového značení a bez izotopového značení („label-free“).

Mezi prefrakcionační metody používané pro separaci peptidů patří např. kapalinová chromatografie HILIC (rozdělení peptidů podle hydrofilicity) (McNulty a Annan, 2008) a kapalinové iontoměničové chromatografie SAX (strong anionic ion-exchange chromatography) a SCX (strong cationic ion-exchange chromatography) (Beausoleil *et al.*, 2004). SAX a SCX dělí fosfopeptidy podle jejich náboje. Pomocí SCX jsou vychytávány fosfopeptidy s pozitivním nábojem, vazbou na negativně nabitou chromatografickou matrix (Beausoleil *et al.*, 2004). Naopak použitím SAX jsou selektovány negativně nabitě fosfopeptidy kladně nabitou chromatografickou matrix (Nie *et al.*, 2010).

Po frakcionaci kapalinovou chromatografií jsou fosfopeptidy identifikovány MS. Před MS analýzou mohou být vzorky obohaceny o fosfopeptidy použitím afinitních obohacujících metod např. MOAC, IMAC a chromatografie s hydroxyapatitem (Dunn *et al.*, 2010). Poslední zmiňovaná metoda využívá jako matici hydroxyapatit a je schopná oddělit fosfoproteiny s různým stupněm fosforylace (Mamone *et al.*, 2010). Dalšími používanými obohacovacími metodami fosfopetidů jsou chemické modifikace (Zhou *et al.*, 2001), použití protilátek a srážení fosfopeptidů. Během srážení je vzorek rozpuštěn v roztoku hydrogenfosforečnanu sodného. Přidáním chloridu vápenatého vznikne sraženina obsahující fosforečnan vápenatý s fosfopeptidy, které jsou poté odděleny centrifugací (Gomori a Benditt, 1953; Zhang *et al.*, 2007). Samotným fosfopeptidovým srážením je získána velmi nízká koncentrace fosfopeptidů a některé z nich potom nejsou identifikovány. Lepších výsledků bylo dosaženo spojením fosfopeptidového srážení s  $\text{Fe}^{3+}$ -IMAC. Touto kombinací bylo dosaženo lepších výsledků než použitím samotné IMAC metody a je používána pro obohacení komplexních vzorků (Xia *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007).

Oproti gelovému přístupu tímto negelovým přístupem nedochází ke ztrátám malých, lipofilních a extrémně alkalických nebo zásaditých proteinů. Chromatografické metody využívané v tomto přístupu jsou lépe aplikovatelné pro peptidy než na proteiny. Chromatografická separace je citlivější oproti 2-DE, dochází k identifikaci i méně zastoupených fosfopeptidů ve vzorku. Limitací tohoto přístupu je fakt, že směs obohacených peptidů pochází z různých proteinů. Proteiny mohou obsahovat široce rozšířené konzervované domény, skládající se z peptidů, které mohou zahrnovat

konzervované oblasti, což může vést k záměně identifikovaného proteinu. A v neposlední řadě tímto přístupem není zjištěn izoelektrický bod ani molekulová hmotnost proteinu (Ito *et al.*, 2009).

#### **2.8.2.1. Identifikace a kvantifikace fosfoproteomu pomocí hmotnostní spektrometrie**

Separované či prefrakcionované bílkoviny jsou následně identifikovány pomocí MS. Existují 2 přístupy spojené s negelovými technikami, které se při analýze fosfoproteomu využívají.

##### **2.8.2.1.1 Izotopové značení proteinů (iTRAQ)**

Touto metodou se dají porovnat dva i více proteinových vzorků najednou. Soupravy pro iTRAQ kvantifikaci proteinů a peptidů jsou dostupné u firmy SIGMA. Proteiny, pocházející z různých vzorků jsou štěpeny a peptidy barveny izotopovými značkami a poté jsou před LC-MS analýzou smíchány dohromady. Výsledek analýzy je vyjádřen ve formě píků, které představují jednotlivé peptidy, kdy stejné peptidy z různých vzorků budou tvořit přilehlé píky. Kvantitativní poměr zastoupení peptidů je vypočítán z průměru intenzity píku. Výhodou této metody je snadné mapování peptidů ze dvou vzorků. Také je tato metoda spolehlivější pro vypočítání kvantitativního poměru zastoupení peptidů z poměru intenzity píku, v důsledku smíchání vzorků před LC-MS analýzou. Nevýhodou tohoto přístupu je, že může dojít k poškození proteinů vlivem používaných chemikálií (Zieske, 2006; Timms a Cutillas, 2010; Lin *et al.*, 2013).

##### **2.8.2.1.2 Kvantifikace bez použití izotopových značek („label free“)**

V rámci této metody pro kvantifikaci proteinů bez použití izotopových značek tzv. „label-free“ je oproti předchozímu přístupu každý vzorek analyzován zvlášť pomocí LC-MS a metoda není tolik limitována výběrem vzorků. V každém měření bude mít stejný peptid stejný  $m/z$  poměr (poměr hmotnosti a náboje proteinu) a podobný retenční čas LC. Takto je možné vytvořit mapu, která bude obsahovat signály peptidů z různých vzorků. Kvantitativní poměr zastoupení peptidů je vypočítán z intenzity signálu (plochy píku). Výhodou tohoto postupu je, že nedochází ke ztrátám ani poškození vzorku, ke kterým v předchozí metodě dochází během barvícího kroku. Další výhodou této metody je, že není omezená počtem vybraných barev. Nevýhodou je nižší přesnost a náročnější zpracování dat (Timms a Cutillas, 2010; Lin *et al.*, 2013).

### 2.8.3. Metody obohacení fosfoproteinů a fosfopeptidů – afinitní metody

V dnešní době jsou nejčastěji používanými obohacovacími technikami fosfoproteinů metody založené na afinitní chromatografii.

V rámci afinitních metod jsou používány pozitivně nabitě matrice, např. kationty kovů vázané na nosiči nebo samotné částice oxidů a hydroxidů kovů na něž se vážou záporně nabitě fosfátové skupiny (Andersson a Porath, 1986). Mezi obohacovací afinitní techniky patří afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech tzv. chelatační afinitní chromatografie **IMAC** (immobilized metal affinity chromatography). IMAC metoda je vhodná pro studium globálního serinového, treoninového a tyrosinového fosfoproteomu (Paradela a Albar, 2008). Tato metoda využívá vázaných kovových kationtů na chelatační ligand. Nejpoužívanějšími chelatačními ligandy jsou kyselina iminodietová (IDA) a kyselina nitrilotrioctová (NTA). Z kovových kationtů bývají nejčastěji používané kationty  $\text{Fe}^{3+}$  (Neville *et al.*, 1997),  $\text{Zr}^{4+}$  (Feng *et al.*, 2007),  $\text{Ga}^{3+}$  (Posewitz a Tempst, 1999) a  $\text{Ti}^{4+}$  (Zhou *et al.*, 2008). Tato metoda je zatím nejpoužívanější metodou pro obohacení fosfopeptidů. Pro obohacení fosfoproteinů jsou používány  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty v kombinaci s NTA nebo IDA (Collins *et al.*, 2005; Dubrovská a Souhelnytskyi, 2005; Machida *et al.*, 2007). Bylo ale potvrzeno, že IDA je účinnější než NTA a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty jsou lepší než  $\text{Fe}^{3+}$  (Machida *et al.*, 2007). IMAC metoda může být použita i jako předfrakcionační technika, po níž je obohacená frakce štěpena proteázou s následným obohacením o fosfopeptidy jinou metodou.

Důležité pro IMAC fosfopeptidové i fosfoproteinové obohacení je odstranění nukleových kyselin obsažených vzorku. Protože nukleové kyseliny se vážou na IMAC matrix, což vede ke ztrátě afinity k fosfopeptidům (Li *et al.*, 2009).

Variací IMAC metody, je **Phos-Tag** obohacení, které je používáno pro obohacení fosfoproteinů i fosfopeptidů. Phos-tag (1,3-bis [bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato dizinc) komplex připojený k agaróze slouží jako matrice (Kinoshita *et al.*, 2006).

Dalším příkladem afinitní metody je MOAC afinitní chromatografie, která jako matrici využívá oxidy nebo hydroxidy kovů a není třeba vazby na resin (IDA, NTA). Pro obohacení fosfoproteinů bývá používán hlavně hydroxid hlinitý a pro obohacení fosfopeptidů oxid titaničitý. (Leitner, 2010). Vlastností těchto kovových oxidů a hydroxidů je nerozpustnost ve vodě. V kyselém prostředí mají pozitivní náboj a mohou tedy vychytat záporně nabitě fosfoproteiny (Wolschin *et al.*, 2005; Tombácz, 2009).

Mezi chromatografické afinitní metody patří i imunoafinitní chromatografie, která využívá specifické interakce antigenu s protilátkou za účelem separace proteinů nebo peptidů nesoucí požadovaný antigen z komplexní směsi proteinů (Welbeck *et al.*, 2011). Použitím protilátek je možné identifikovat a lokalizovat extracelulární i intracelulární proteiny (Lipman *et al.*, 2005). Protilátkami je možné také detekovat patogeny, toxiny a zbytky léčivých látek, chemikálie, pesticidy a jiné znehodnocující látky v potravinách (Myers a Yamazaki, 1997; Kramer a Hock, 2003; Bremer *et al.*, 2009; Chen a Zhuang, 2009; Zhong *et al.*, 2010; Ahn *et al.*, 2011; Esteve-Turrillas, 2011). U některých přístupů je nezbytná příprava protilátky. Ty mohou být izolovány např. z plazmy nebo krevního séra, z rostlinných extraktů, bakteriálních nebo kvasinkových kultur (Grodzki a Berenstein, 2010). Protilátky (ligandy) musí být vázány na nosič (matrix). Tím můžou být přírodní materiály jako je agaróza, dextróza nebo celulóza. Mezi syntetické matrix patří např. akrylamid (Verdoliva *et al.*, 2002) či polystyren (Staak *et al.*, 1996) a mezi anorganické matrice např. porézní křemen (Xi a Wu, 2004) nebo sklo (Schuster *et al.*, 2000).

Další afinitní metodou využívající k obohacení interakci protilátky s antigenem je imunoprecipitace fosfoaminokyselinovou selektivní protilátkou. Tuto technologii je nejvhodnější použít pro identifikaci fosfoproteinů (Imam-Sghiouar *et al.*, 2002; Lind *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2000) nebo fosfopeptidů fosforylovaných na tyrosinu (Rush *et al.*, 2005; Zhang a Neubert, 2006; Ville'n *et al.*, 2007). Uspokojivých výsledků fosfoproteinového obohacení bylo dosaženo i použitím komerčně dostupných fosfo-selektivních fosfoserinových a fosfotreoninových protilátek, které jsou ale používány v kombinaci s Western blotem (Grønborg *et al.*, 2002). Nevýhodou tohoto přístupu je, že použitím jedné protilátky jsou vychytány proteiny, které mají fosforylovanou pouze jednu příslušnou aminokyselinu. Aby byly vychytány všechny fosforylované aminokyseliny, je nutné použít více typů protilátek nebo zvolit jinou metodu obohacení, která vychytá všechny fosforylované aminokyseliny najednou např. IMAC a MOAC. Tato metoda je tedy vhodná k použití v případě, že nás zajímá jen jedna určitá skupina fosfoproteinů (Zhang a Neubert, 2006) a je nevhodná pro imunoprecipitaci ve velkém měřítku, zahrnující celý fosfoproteom (Molina *et al.*, 2007).

Pro separaci proteinů o nízkém zastoupení v proteinovém komplexním vzorku je vhodné využít jednoduchou, rychlou a cenově dostupnou afinitní separační metodu založenou na technologii magnetických kuliček, které jsou obaleny agarózou nebo jiným

polymerickým materiálem, na který je imobilizována protilátka nebo jiný ligand. Interakcí antigenu s protilátkou dojde k navázání proteinu na ligand (protilátku) imobilizovaný na magnetické kuličky, které následně mohou být ze vzorku spolu s navázaným proteinem rychle separovány vlivem magnetických sil (Safarik a Safarikova, 2004).



### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

První část této práce se zabývá identifikací nového substrátu proteinkinázy StkP u *S. pneumoniae*.

Byly stanoveny tyto úkoly:

- Identifikovat nízkomolekulární protein P15, pravděpodobný substrát proteinkinázy StkP pomocí frakcionace, obohacení fosfoproteinů pomocí afinitní chromatografie a následné analýzy hmotnostní spektrometrií.
- Provést delecí genu kódujícího identifikovaný protein v *S. pneumoniae* a analyzovat fosforylační profil delečního kmene.

Druhá část práce se zabývá fosforylací FtsA, esenciálního proteinu buněčného dělení *S. pneumoniae*.

Byly stanoveny tyto úkoly:

- Připravit vektor pro expresi *ftsA* s fosfoablativní záměnou T404A v *E. coli* a exprimovat a purifikovat rekombinantní protein.
- Prostřednictvím kinázové reakce v přítomnosti StkP potvrdit fosforylaci zbytku T404 *in vitro*.
- Připravit merodiploidní kmeny *S. pneumoniae* obsahující gen *ftsA* v nativním lokusu a jeho nativní nebo mutovanou formu *T404A*, pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru v ektopickém lokusu.
- Ověřit fosforylaci mutované i nativní formy FtsA *in vivo*.
- Provést delecí *ftsA* v nativním lokusu a ověřit životaschopnost kmene kódující pouze ektopickou kopii mutované formy *ftsA-T404A*.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Biologický materiál

#### 4.1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Rod *Pneumococcus*, z rodiny *Lactobacillaceae*, je řazen do skupiny  $\alpha$ -hemolytických streptokoků Bergeyova systému (1984 – 89).

Pro pokusy v této diplomové práci byly použity kmeny uvedené v Tab. 1.

kmen	genotyp	fenotyp	zdroj
Sp1 Cp1015	Rx derivate; <i>strI</i> , <i>hexA</i>	Rx neopouzdřený divoký kmen, StrR	M. C. Trombe
Sp113	Rx <i>AphpP</i>	$\Delta$ phpP; StrR	J. Goldová
Sp155	Rx derivate; <i>strI</i> , <i>hexA</i>	Rx neopouzdřený divoký kmen, StrR	O. Massidda
Sp208	R6 derivate	R6 neopouzdřený divoký kmen	M. Oggioni
Sp346	Rx $\Delta$ spr0595:: <i>sacB</i> -kan- <i>rpsL</i>	StrS 500ug/ml, KanR 200ug/ml, SuS 10 %	tato práce
Sp347	R6 $\Delta$ spr0595:: <i>sacB</i> -kan- <i>rpsL</i>	StrS 500ug/ml, KanR 200ug/ml, SuS 15 %	tato práce
Sp356	Rx <i>bga</i> :: <i>PczcD</i> -gfp- <i>ftsA</i>	Expres GFP-FtsA pod inducibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce
Sp357	Rx <i>bga</i> :: <i>PczcD</i> -gfp- <i>ftsA</i> -T404A	Expres GFP-FtsA-T404A pod inducibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce
Sp358	Rx $\Delta$ stkP <i>bga</i> :: <i>PczcD</i> -gfp- <i>ftsA</i>	Expres GFP-FtsA pod inducibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí $\Delta$ stkP kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce
Sp359	Rx $\Delta$ stkP <i>bga</i> :: <i>PczcD</i> -gfp- <i>ftsA</i> -T404A	Expres GFP-FtsA-T404A pod inducibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí $\Delta$ stkP kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce
Sp360	R6 <i>bga</i> :: <i>PczcD</i> -gfp- <i>ftsA</i>	Expres GFP-FtsA pod inducibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí divokého R6 kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce
Sp361	R6 <i>bga</i> :: <i>PczcD</i> -gfp- <i>ftsA</i> -T404A	Expres GFP-FtsA-T404A pod inducibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí divokého R6 kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce

Sp373	Rx <i>Δspr0595</i>	StrS 500ug/ml, KanR 200ug/ml, SuS 10 %	tato práce
Sp374	R6 <i>Δspr0595</i>	StrS 500ug/ml, KanR 200ug/ml, SuS 15 %	tato práce
Sp404	Rx <i>ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA</i>	FtsA depleční kmen; exprese GFP-FtsA pod indukibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx <i>ΔftsA</i> kmene; TetR (2,5 ug/ml), CmR (4,5 ug/ml)	tato práce
Sp405	Rx <i>ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A</i>	FtsA depleční kmen; exprese GFP-FtsA-T404A pod indukibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx <i>ΔftsA</i> kmene; TetR (2,5 ug/ml), CmR (4,5 ug/ml)	tato práce
Sp411	Rx <sub>Sp155</sub> <i>bga::PczcD-gfp-ftsA</i>	Expresa GFP-FtsA pod indukibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce
Sp412	Rx <sub>Sp155</sub> <i>bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A</i>	Expresa GFP-FtsA-T404A pod indukibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx kmene; TetR (2,5 ug/ml)	tato práce
Sp413	Rx <sub>Sp155</sub> <i>ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA</i>	FtsA depleční kmen; exprese GFP-FtsA pod indukibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx <i>ΔftsA</i> kmene; TetR (2,5 ug/ml), CmR (4,5 ug/ml)	tato práce
Sp414	Rx <sub>Sp155</sub> <i>ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A</i>	FtsA depleční kmen; exprese GFP-FtsA-T404A pod indukibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx <i>ΔftsA</i> kmene; TetR (2,5 ug/ml), CmR (4,5 ug/ml)	tato práce
AM417	Rx <sub>Sp155</sub> <i>ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA</i>	FtsA depleční kmen; exprese FtsA-GFP pod indukibilním zinkovým promotorem v <i>bgaA</i> lokusu na pozadí Rx <i>ΔftsA</i> kmene; TetR (2,5 ug/ml), CmR (4,5 ug/ml)	A. Mura

**Tab. 1. Seznam kmenů *S. pneumoniae* použitých v rámci této diplomové práce.** V tabulce uveden název kmene, jeho genotyp, fenotyp, rezistence k antibiotikům a zdroj.

#### 4.1.2. *Escherichia coli*

V rámci této diplomové práce byly použity pro klonovací a expresní účely následující kmeny *Escherichia coli* (rod *Escherichia*) z rodiny *Enterobacteriaceae*:

**DH5α** (*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15*

*gyrA96 recA1relA1 endA1 thi-1 hsdR17*)

**BL21** (*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*)

**JM109** (*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*)

Použité kmeny jsou uvedeny v Tab. 2 a použité plazmidy v Tab. 3.

č. kmene	genotyp	zdroj
Ec50	BL21; <i>pEXStk-T</i>	lab. archiv
Ec145	BL21; <i>pETPhosLink-1511</i>	lab. archiv
Ec193	JM109; <i>pJWV25-gfp-ftsA</i>	lab. archiv
Ec258	BL21; <i>pETPhosLink-ftsA-T404A</i>	tato práce
Ec265	DH5α; <i>pJWV25-gfp-ftsA-T404A</i>	tato práce

**Tab. 2. Seznam kmenů *E. coli* použitých v rámci diplomové práce.** V tabulce jsou shrnuty kmeny, u nichž je uvedeno číslo kmene, genotyp a zdroj.

plazmid	rezistence
pEXStk-T	KanR 25ug/ml
pETPhosLink-1511	AmpR 100ug/ml
pETPhosLink-ftsA-T404A	AmpR 100ug/ml
pJWV25-gfp-ftsA	<i>E. coli</i> - AmpR 100ug/ml; <i>S. pneumoniae</i> - TetR 2,5 ug/ml
pJWV25-gfp-ftsA-T404A	<i>E. coli</i> - AmpR 100ug/ml; <i>S. pneumoniae</i> - TetR 2,5 ug/ml

**Tab. 3. Seznam použitých plazmidů.** Uveden název plazmidu a typ rezistence.

## 4.2. Vektory

### pETPHosLink

Vektor o velikosti 5704 bp byl navržen pro studium substrátů funkčních membránových partnerů kinázy StkP a fosfatázy PhpP (Canova *et al.*, 2008). Používá se pro expresi proteinu fúzovaným s histidinovou značkou na N-konci, která může být efektivně odstraněna TEV (the tobacco echt virus) proteázou. Histidinová značka neobsahuje žádné serinové ani treoninové zbytky, tudíž nedochází k nespecifické fosforylaci. Na vektoru je také kódován selekční znak - ampicilinová rezistence.

### Využití vektorů

- pETPhosLink-1511: exprese a purifikace proteinu His-FtsA pod IPTG inducibilním promotorem a příprava vektoru pETPhosLink-ftsA-T404A pomocí místně specifické mutagenese
- pETPhosLink-ftsA-T404A: exprese a purifikace proteinu His-FtsA-T404A pod IPTG inducibilním promotorem

### **pJWV25**

Plazmid pJWV25 (Eberhardt *et al.*, 2009) o velikosti 8587, byl navržen pro expresi bílkovin s možností fúze s GFP fluorescenční značkou na N-konci. Exprimované proteiny jsou zde kontrolovány inducibilním zinkovým promotorem  $P_{czcD}$ . Tento vektor obsahuje oblasti DNA *'gatC* a *'bgaA*, které jsou homologní s oblastmi DNA na chromozómu *S. pneumoniae*. Díky nim je za laboratorních podmínek umožněna homologní rekombinace plazmidu do postradatelného lokusu *bgaA* na chromozómu *S. pneumoniae*. Vektor nese selekční znak pro tetracyklinovou rezistenci pro *S. pneumoniae* a ampicilinovou rezistenci pro *E. coli*.

#### Použité vektory:

- pJWV25-gfp-ftsA: exprese proteinu GFP-FtsA pod inducibilním promotorem  $P_{czcD}$  v *S. pneumoniae* a pro místně specifickou mutagenesi genu *gfp-ftsA*.
- pJWV25-gfp-ftsA-T404A: exprese proteinu GFP-FtsA-T404A pod inducibilním promotorem  $P_{czcD}$  v *S. pneumoniae*.

### **pEX**

Vektory pEX vyvinula firma ORIGENE pro expresi proteinů v *E. coli* pod IPTG inducibilním promotorem. Po purifikaci proteinů je možné odstranit His-tag značky TEV proteázou. Tento vektor kóduje selekční znak pro kanamycinovou rezistenci používaný u *E. coli*.

#### Použité vektory:

- pEXStk-T: exprese proteinu His-StkP-KD (kinázová doména kinázy StkP) pod IPTG inducibilním promotorem.

### 4.3. Technické zázemí

- **Sterilizace** – kultivační média a laboratorní sklo byly sterilizovány v autoklávu na servisním pracovišti v rámci MBÚ AV ČR nebo pomocí sterilizačních filtrů Rotilabo®-syringe filters, CME (ROTH), velikost pórů 0,22 µm.
- **Měření pH** - k měření pH kultivačních médií a pufrů bylo použito pH-metru (iontově selektivní skleněná elektroda). Pro kalibraci pH-metru byly použity standartní pufrы: ftalátový (pH = 4,0), fosfátový (pH = 7,0), borátový (pH = 9,0), (komerční souprava, Mettler Toledo).
- **Laboratorní přístroje** – přístroje běžně používané v laboratoři:

#### Centrifugy

- Centrifuge 5417C, (Eppendorf)
- Universal 320R (Hettich)
- Optima™ L-90K Ultracentrifuge (Beckman Coulter), rotor JA-10

#### Cyklery

- Mastercycler gradient (Eppendorf)
- BIOER (GenePro)

#### Elektroforézy

- OWL EASYCAST™ B1A (ThermoScientific)
- ATTO (Atto)

#### Spektrofotometry

- Du® 730 Life Sciences UV/VIS Spectrophotometer (Beckman Coulter®).
- SECOMAM PRIM (BioTech)
- NanoDrop Lite (Thermo Scientific)
- Evolution 201 (Termo Scientific)

#### Váhy

- Sartorius - laboratory / handy (Sartorius)
- Julabo 7A, 5M, U3 (Julabo)

#### Ostatní přístroje

- FastPrep FP120 (ThermoSavant)

- Inkubátor IP30-U (LTE Scientific LTD.)
- GEL BOX, VERTICAL BLOTTER (Labnet)
- Magnetická míchačka s ohřevem (ThermoScientific)
- U.V. Transilluminator (BioTech)
- G:Box Chemi XRQ (SynGene)
- Multiphor II (AP Czech)
- pH metr – PH114 (Snail Instruments)
- skener - EPSON EXPRESSION 10000 XL
- **Programy a software**
  - GeneSnap (SynGene) - snímání obrazu gelu pod UV kamerou
  - SeqBuilder (Lasergene) - navržení genetických map
  - SeqMan (Lasergene) - ověření sekvenovaných částí genomu
  - GeneTolls (SynGene) – vyhodnocení intenzity imunodetekčního signálu
  - GeneSys (SynGene) – vyvolání imunodetekcí
  - PDQuest 8.0.1.(BioRad) – hodnocení proteinů
  - Prism-GraphPad – statistická analýza

#### 4.4. Chemikálie

chemikálie	zkratka/vzorec	firma
Aceton		LACHNER
Agarosa		SIGMA
Adenosintrifosfát	ATP	SIGMA
Akrylamid		SIGMA
Albumin Fraction V	BSA	ROTH
<i>Ammonium persulphate</i>	APS	SIGMA
Ampicilin	Amp	USB
Bacto Brain Heart Infusion	BHI	BD
Bis-akrylamid		SERVA
Benzonáza		MERK
Bromfenolová modř	BBP	LACHEMA
β-merkapt ethanol		SIGMA
Chloramfenikol		AMERSHAM
Chlorid manganatý	MnCl <sub>2</sub>	LACHEMA
Chlorid sodný	NaCl	LACHNER
Coomassie Blue G250		SERVA
Complete, EDTA-free		ROCHE
Deoxycholát sodný	DCNa	SIGMA
Dihydrogen fosforečnan sodný monohydrát	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	LACHEMA
Ditriotreitol	DTT	SERVA

Dodecylsulfát sodný	SDS	SERVA
Glycin		SERVA
Glycerol		LACHNER
Imidazol		SIGMA
Iodacetamid	IAA	SIGMA
Kanamycin	Kan	SIGMA
Kyselina ethylendiamintetraoctová	EDTA	SIGMA
Kyselina fosforečná	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	LACHEMA
Kyselina octová		LACHNER
Kyselina trichloroctová	TCA	SIGMA
Metanol	MetOH	LACHNER
Pharmalyt®		SIGMA
Síran hlinitý	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	LACHNER
Tetracyklin	Tet	USB
Tetrametyletylendiamin	TEMED	SERVA
Thiourea		SIGMA
Tris-base		SIGMA
Tris-HCl		SIGMA
Tween 20 (polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)		SIGMA
Urea		APPLICHEM
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate	CHAPS	SIGMA

#### 4.5. Pufry a roztoky

Pro přípravu pufrů a roztoků byla použita deionizovaná voda. Hodnota pH byla upravena na požadovanou hodnotu použitím HCl (koncentrovaná nebo 1 M) nebo NaOH (1 M). Většina pufrů byla skladována při 4 °C.

##### Izolace bílkovin *S. pneumoniae*

- Lyzační pufr: 25 mM Tris-base; 50 mM NaCl; pH 7,5
- Diluční pufr 10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; pH 7,5
- SEDS (A+B, 24:1) A: 150 mM NaCl; 30 mM EDTA, pH 8,0  
B: 0,5 % DCNa; 0,25 % SDS

##### Izolace, purifikace (NiNTa kolonka), dialýza bílkovin *E. coli*

- Lyzační pufr 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 300 mM NaCl, 10 mM imidazol; pH 8,8
- Omývací pufr 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol; pH 8,0
- Eluční pufr 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol; pH 8,0



- Dialyzační pufr 25 mM Tris-base; 100 mM NaCl; pH 7,5

### SDS-PAGE

- Elektrodotový pufr 25 mM Tris-base; 192 mM glycine; 0,1% SDS; pH 8,3
- Vzorový pufr (SB) 5X: 350 mM Tris-base; 20% glycerol; 15% SDS; 25%  $\beta$ -merkaptoetanol; BBP; pH 6,8
- Akrylamid 30% akrylamid; 0,8% bis-akrylamid, přefiltrováno
- 1,5 M Tris; pH 8,8
- 0,5 M Tris; pH 6,8
- 10% SDS skladován při laboratorní teplotě
- 10% APS používán vždy čerstvý roztok
- Lyzační pufr na 2-DE 7 M urea; 2M thiourea; 4% CHAPS; 1% pharmalyt® (3-10); 0,1% DTT
- Ekvilibrační pufr 50 mM Tris-HCl; 6 M urea; 30% glycerol; 2% SDS

### Přenos bílkovin na PVDF membránu

- Blotovací pufr 48 mM Tris-base; 39 mM glycine; 0,0375% SDS; 20% metanol

### Imunodetekce

- TBS-T 20 mM Tris-base; 137 mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH 7,6

### Manipulace s DNA

- TAE pufr 40 mM Tris-base; 2 mM EDTA; pH 8,5
- DNA Loading Dye 6X (Thermo Scientific)

### Manipulace s bílkovinami

- Kinázový pufr 25 mM Tris-base; 25 mM NaCl; 5 mM  $MnCl_2$ ; 10  $\mu$ M ATP; pH 7,5
- CCB barvení 0,02% Coomassie blue G250; 5%  $Al_2(SO_4)_3$ , 10% čistý etanol; 2%  $H_3PO_4$ , (Dyballa a Metzger, 2009)

## 4.6. Půdy a média

Množství jednotlivých složek tekutých kultivačních půd je udáváno na objem 1 l, pokud není uvedeno jinak. Pro přípravu médií a kultivačních půd byla použita destilovaná voda. Média byla sterilizována v autoklávu. Do pevných půd byl přidáván 1,5% agar. Selekční půdy a média byly připraveny přidáním příslušného antibiotika v následujících koncentracích: *E. coli*: ampicilin 100 µg/ml; *S. pneumoniae*: tetracyklin 2,5 µg/ml; kanamycin 50 µg/ml; ampicilin 100 µg/ml; chloramfenikol 4,5 µg/ml.

### *Streptococcus pneumoniae*

**BHI** („bacto brain heart infusion“) médium: 37 g

**TSB** („tryptic soy broth“) médium: 30 g

**KA** (krevní agar; pevné médium): 42 g Kolumbia agar + 5 % beranní defibrinovaná krev

**Gelóza** (pevné médium): glukóza 1 g; NaCl 5 g; neopepton 5 g; Tris-base 1,25 g; casiton 10 g; agar 10 g

### *Escherichia coli*

**LB** („Luria broth“) médium: trypton 10 g; kvasinkový extrakt 5 g; NaCl 10 g; pH 7,5

## 4.7. Enzymy

- Polymerázy
  - Phusion polymeráza (New England Biolabs - NEB)
  - PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent Technologies)
  - Taq polymeráza (Top Bio, Qiagen, Sigma Aldrich®)
- Restrikční enzymy
  - *PvuI*, *NdeI* (NEB)
- Ostatní enzymy
  - Benzonáza® (Merk)
  - Lysozym Proteináza K (Sigma-Aldrich®)

## 4.8. Kazety

### 4.8.1. Sweet Janus kazeta (*sacB-kan-rpsL*)

Sweet Janus kazeta je modifikovaná Janus kazeta (Li *et al.*, 2014). Janus kazeta kóduje kanamycinovou rezistenci a *rpsL*<sup>+</sup> alelu, díky které buňky získávají senzitivitu

ke streptomycinu (Sung *et al.*, 2001). Sweet Janus kazeta navíc obsahuje gen *sacB* z *B. subtilis*, udělující buňce senzitivitu k sacharóze (Li *et al.*, 2014).

#### 4.9. Protilátky

- Polyklonální myši P-Thr protilátka (Cell Signalling) - kat. č. #9381, použité ředění 1:2000 nebo 1:70 000 (podle citlivosti použitého ECL (enhanced luminol-based chemiluminescent) substrátu)
- Anti-Rabbit IgG (SIGMA) – sekundární konjugovaná s peroxidázou, kat. č. A8275-1ML, použité ředění 1:2000; 1:10 000 (podle citlivosti použitého ECL substrátu)
- Polyklonální králičí StkP protilátka (anti-PASTA (C-Stk1)) (Apronex), použité ředění 1:50 000
- Anti-FtsA (Orrietta Massidda), použité ředění 1:20 000
- Polyklonální králičí P-Thr protilátka imobilizovaná na magnetických kuličkách (Cell Signaling), kat. č. #8859

#### 4.10. Komerční soupravy a standardy

- QIAquick® - Gel Extraction Kit (G250), (QIAGEN); kat. č. 28706
- QIAprep® Spin – Miniprep kit (250), (QIAGEN); kat. č. 27106
- QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)
- Ni-NTA agarose (Qiagen); kat. č. 30210
- Imobiline™ Dry Strip; pH 4-7, 18 cm (GE Healthcare); kat. č. 17-1233-01
- DNA clean & Concentrator™-25 (Zymo Research); kat. č. D4005
- SLIDE-A-LYZER® dialysis Cassette (Thermo Scientific); kat. č. 66203
- Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- MinElute™ Reaction CleanUp Kit (Qiagen)
- SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific); kat. č. 34080
- WesternBright Sirius HRP substrate (Advanta); kat. č. K-12043-D10

#### 4.11. Použité oligonukleotidy

název	sekvence	použití
AU154	GAAAGAATCTCTTCTGAAAAGT	Delece <i>spr0595</i> pomocí fúzní PCR. Amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce před genem <i>spr0595</i> spolu s oligonukleotidem AU155 (1021 bp)
AU155	atcaaacggatcgatccttaaAATCCAAG TAACCATTAGTTCT	Delece <i>spr0595</i> pomocí fúzní PCR. Amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce za genem <i>spr0595</i> spolu s oligonukleotidem AU154 (1021 bp). Tučně vyznačena sekvence komplementární k oligonukleotidu DP1 (SweetJanusF).
AU156	tactaaacgtccaaaagcataaCCTTATTT CCAAATTAGTCGAA	Delece <i>spr0595</i> pomocí fúzní PCR. Amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce za genem <i>spr0595</i> spolu s oligonukleotidem AU157 (996 bp). Tučně vyznačena sekvence komplementární k oligonukleotidu DP2 (SweetJanusR).
AU157	AGCTCAAAATATCGATACAGG	Delece <i>spr0595</i> pomocí fúzní PCR. Amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce za genem <i>spr0595</i> spolu s oligonukleotidem AU156 (996 bp).
DP1	TTAAGGATCGATCCGTTTGATT	Amplifikace Sweet Janus kazety spolu s oligonukleotidem DP2.
DP2	TTATGCTTTTGGACGTTTAGTA	Amplifikace Sweet Janus kazety spolu s oligonukleotidem DP1.
AU124	AGTTTTGGTGGGATGCTGCAAA AAG <u>A</u> CGCTCAGTTTGT	Místně specifická mutageneze <i>ftsA</i> - záměna treoninu v pozici 404 za alanin (triplet označen tučně, bodová záměna označena podtržením). Jako templát použit vektor pETPhosLink-1511.
AU125	ACAAACTGAGCTG <u>C</u> TTTTTTGCA GCCATCCCACCAAACT	Místně specifická mutageneze <i>ftsA</i> - záměna treoninu v pozici 404 za alanin (triplet označen tučně a bodová záměna označena podtržením). Jako templát použit vektor pETPhosLink-1511.
AU158	GA <u>A</u> CTAATGGTTACTTGGATT CCTTATTTCCAAATTAGTCGAA	Delece Sweet Janus kazety pomocí fúzní PCR. Amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce za genem <i>spr0595</i> spolu s oligonukleotidem AU159 (1000 bp). Tučně vyznačena sekvence komplementární k oligonukleotidu AU159.
AU159	AATCCAAGTAACCATTAGTTCT	Delece Sweet Janus kazety pomocí fúzní PCR. Amplifikace up-stream oblasti genu <i>spr0595</i> spolu s oligonukleotidem AU158 (1000 bp).
LN142	AGGACAAGAGTTTTTCTTTGG	Ověření integrace komplementačního konstruktů do <i>spr0564-0565</i> lokusu ( <i>bgaA</i> lokusu) na chromozómu <i>S. pneumoniae</i> .
BP24 F	GTCTTTGGCGTCCGTGTC	Sekvenace plazmidu pETPhosLink-ftsA-T404A pro ověření správnosti bodové mutace. Ověření integrace genu <i>ftsA</i> do <i>bgaA</i> lokusu <i>S. pneumoniae</i> spolu s oligonukleotidem LN142.
BP23 F	GGACCTCGTACTATCTTGAC	Testování přítomnosti plazmidů pETPhosLink-1511 a pETPhosLink-FtsA-T404A v <i>E. coli</i> spolu s AM07.
T7 F	TAATACGACTCACTATAGGG	Univerzální oligonukleotid; ověření správnosti sekvenace plazmidu pJWV25-gfp-ftsA-T404A a pETPhosLink-ftsA-T404A

AM07 R	GCTGGATTACGGATACCAAC	Testování přítomnosti plazmidů pETPHosLink-1511 a pETPHosLink-FtsA-T404A v <i>E. coli</i> spolu s BP23 F.
AM05 F	AAGCGTGACCACATGGTC	Ověření správnosti sekvence plazmidů pJWV25-gfp-ftsA-T404A a pJWV25-PZnFtsA-T404A, spolu s AM08
AM08 R	ACACCGCTCTTGTCAGCT	Ověření správnosti sekvence plazmidů pJWV25-gfp-ftsA-T404A a pJWV25-PZnFtsA-T404A, spolu s AM05.
ADF1 F	AACCAAGCCGCCCAAATTTG	Sekvenace deplečních kmenů.
AKOF1 F	TGCCACTGTCAGAAAGCCTA	Amplifikace delečního konstruktů <i>ftsA::P<sub>less</sub>cat</i> spolu s ADR6.
ADR6 R	GCTTTACGACCAACCTCAGG	Amplifikace delečního konstruktů <i>ftsA::P<sub>less</sub>cat</i> spolu s AKOF1 a sekvenace deplečních kmenů
AU179 F	TTAGGAGGCATATCAAATGAA	Ověření rekombinace <i>ftsA::P<sub>less</sub>cat</i> do chromozómu <i>S. pneumoniae</i> spolu s LN167.
LN167 R	GGTAATCCCTTGAACACCTTG	Ověření rekombinace <i>ftsA::P<sub>less</sub>cat</i> do chromozómu <i>S. pneumoniae</i> spolu s AU179.

**Tab. 4. Seznam oligonukleotidů.** V tabulce uveden pracovní název, sekvence a jeho použití.

## 4.12. Kultivace bakterií

### 4.12.1. Kultivace *S. pneumoniae*

Bakterie *S. pneumoniae* byly kultivovány buď v tekutém médiu (BHI, TSB), staticky ve vodní lázni bez vzdušnění při teplotě 37 °C, nebo na pevných půdách. Pro tento účel byly použity Petriho misky s gelózou nebo s krevním agarem, do kterých bylo přidáváno, v případě přípravy selekčních půd, příslušné antibiotikum (tetracyklin - 2,5 µg/ml; kanamycin - 50 µg/ml; ampicilin 100 µg/ml; chloramfenikol 4,5 µg/ml). Misky s bakteriální kulturou byly kultivovány přes noc v termostatu při teplotě 37 °C.

Kultivace probíhaly v tekutém médiu do O.D.<sub>600</sub> = 0,45-0,60, kdy byl růst ukončen. V případě fosforylačních pokusů byl před ukončením růstu přidán ampicilin (c = 0,66 µg/ml), který má vliv na úroveň (zvýšení) fosforylace bílkovin fosforylovaných StkP kinázou.

V případě potřeby indukce exprese genů regulovaných zinkovým inducibilním promotorem byly tyto kmeny kultivovány v přítomnosti různých koncentrací ZnCl<sub>2</sub> (0 - 0,65 mM).

#### 4.12.1.1. Glycerolové konzervy pro uchování *S. pneumoniae*

Glycerolové konzervy *S. pneumoniae* byly připravovány z narostlé kultury do O.D.<sub>600</sub> = 0,3 - 0,4. Takto narostlá kultura byla následně rozdělena po 750 µl

do mikrozkušavek s 250 µl 60% glycerolu (výsledná koncentrace glycerolu byla v konzervě 15 %) a uchována v -80 °C.

#### **4.12.2. Kultivace *E. coli***

Kultury *E. coli* byly kultivovány v tekutém LB médiu přes noc, při teplotě 37 °C za stálého třepání (200 rpm). Pro kultivaci na pevném médiu bylo použito LB médium s přidavkem 1,5% agaru a kultivováno v termostatu při 37 °C přes noc. Pro selekci bylo použito antibiotikum ampicilin (100 µg/ml).

##### **4.12.2.1. Glycerolové konzervy pro uchování *E. coli***

Z narostlé bakteriální kultury bylo odebráno 750 µl kultury do předem připravené mikrozkušavky s 250 µl 60% glycerolu (výsledná koncentrace glycerolu v konzervě 15 %) a uchováno v -80 °C.

#### **4.13. Manipulace s *S. pneumoniae***

##### **4.13.1. Mikroskopie**

Buňky *S. pneumoniae* byly pozorovány pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81, použitím olejového imerzního objektivu 100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil a fluorescenčních filtrů. Obraz byl snímán kamerou Olympus FV2T Digital B/W Fireware a zpracován programem Cell<sup>R</sup> verze 2.0.

Mikroskopie byla použita pro lokalizaci proteinů fúzovaných s GFP a pro měření velikosti buněk.

##### Příprava preparátu

3 µl kultury, narostlé v BHI médiu za standardních podmínek do O.D.<sub>600</sub> = 0,36, byly odebrány a pipetovány do středu podložního sklíčka. Poté byl vzorek překryt BPS bločkem (roztok PBS: 137 mM NaCl; 3 mM KC; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 1,8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4). Takto připravený preparát byl zafixován do mikroskopovací komůrky a připraven k použití.

##### **4.13.2. Transformace DNA do buněk *S. pneumoniae***

Transformace probíhala v TSB nebo BHI médiu upraveném tak, aby umožňovala navodit stav kompetence buněk *S. pneumoniae*. K 10 ml média bylo přidáno 100 µl CaCl<sub>2</sub>

a 250  $\mu$ l 8% BSA, pH bylo upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu 8,0. Do takto připraveného kompetenčního média bylo očkováno 50  $\mu$ l bakteriální kultury *S. pneumoniae* ( $O.D_{600} = 0,4$ ) a přidána DNA připravená k transformaci (1  $\mu$ g chromozomální DNA nebo 50 ng PCR produktu či plazmidové DNA). Před počátkem inkubace bylo do směsi přidáno 250 ng CSP (Competence Stimulating Peptide) feromonu, stimulujícího kompetenci. Takto připravená transformační směs byla inkubována 2,5 hodiny staticky ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Poté byla tato transformační směs buněk ředěna ve vytemperovaném médiu a vysévána po 100  $\mu$ l od každého ředění ( $0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ) na Petriho misky (6 cm) a zalévána 6 ml gelózy s příslušným selekčním antibiotikem. Pro kontrolu životaschopnosti kultury byla do gelózy vyseta i směs buněk o vyšším ředění ( $10^{-4}, 10^{-5}$ ) bez přídavku antibiotik. Vše inkubováno přes noc při 37 °C v termostatu.

#### **4.13.3. Izolace proteinů z kultur *S. pneumoniae***

V rámci této práce byly buňky rozbíjeny mechanicky použitím skleněných kuliček na přístroji FastPrep, nebo byla použita metoda chemické dezintegrace buněk použitím SEDS roztoku. Tento roztok obsahuje deoxycholát sodný, který destabilizuje buňky.

##### **4.13.3.1. Příprava rychlých proteinových vzorků z kultur *S. pneumoniae* chemická dezintegrace buněk - SEDS lyzáty**

Z exponenciálně rostoucí kultury *S. pneumoniae* bylo odebráno množství odpovídající 1 ml kultury o  $O.D_{600} = 0,4$ . Kultura bakterií byla centrifugována ( $17950 \times g$ , 2 min) a médium (supernatant) bylo odstraněno. Pelet byl resuspendován ve 20  $\mu$ l SEDS roztoku a tato suspenze byla inkubována v 37 °C, dokud nedošlo k lýzi buněk. To se projevilo projasněním roztoku. Délka inkubace závisela na bakteriálním kmeni, nicméně obvyklá doba byla kolem 10-15 minut. Následně bylo ke vzorku přidáno 20  $\mu$ l 2x SB a vše bylo povařeno 10 min při 99 °C. Takto připravené vzorky byly nanášeny na 1-DE nebo uchovány pro pozdější použití v -20 °C.

##### **4.13.3.2. Izolace celkové proteinové frakce *S. pneumoniae* – „FastPrep“**

Bakteriální kultura *S. pneumoniae* byla kultivována v 500 ml média do  $O.D_{600} = 0,62$  a následně centrifugována ( $8600 \times g$ , 4 °C, 5 minut). Supernatant (kultivační médium) byl slit a peleta s buňkami byla opětovně stočena od zbytků média a pak resuspendována ve 3,5 ml lyzačního pufru s přídavkem inhibitoru proteáz

Complete® (ředění 100x). Poté bylo přidáno 1,5 µl benzonázy. Buňky byly následně rozbíjeny pomocí skleněných kuliček na přístroji „FastPrep“ (nastavení přístroje: rychlost: 4,5; čas: 20 s; cyklus opakován 4x, vzorky mezi jednotlivými cykly chlazeny 2 min na ledu). Následná inkubace lyzátu 30 minut na ledu. Lyzát zbaven nečistot pomocí centrifugace (2700 x g, 10 minut, 4° C). Frakce celkových proteinů z buňky (supernatant) byla dále označována jako hrubý extrakt (**HE**).

#### **4.13.3.3. Izolace membránové frakce *S. pneumoniae***

Celý objem získaného celkového buněčného lyzátu (**HE**) byl rozdělen na cytoplazmatickou (**CF** - supernatant) a membránovou (**MF** - peleta) frakci ultracentrifugací při 100 000 x g, 4 °C, 60 min (ultracentrifuga Beckman typ Optima™ L-90K, rotor SW41Ti). Peleta s **MF** byla resuspendována ve 300 µl lyzačního pufru. Všechny frakce byly dále uchovány v -80 °C.

#### **4.13.3.4. Purifikace fosforylovaných membránových bílkovin *S. pneumoniae* pomocí „P-Threonine antibody - polyclonal Rabbit (magnetic bead conjugate)“**

K separaci fosfoproteinů byla použita P-Thr protilátka, imobilizovaná na magnetických kuličkách (Cell Signalling). Bylo postupováno dle instrukcí výrobce s malými odchylkami. Stručně: k 100 µl **MF** bylo přidáno 20 µl anti-P-Thr imobilizované protilátky proti P-Thr na magnetické kuličky. Inkubace probíhala přes noc na rotátoru při 4 °C. Pro další analýzu byly jímány i frakce, které protekly – fluát (**FL**) i oplachové frakce (**W1 – W5**). Proteiny navázané na kuličkách byly uvolněny přidávkem 40 µl vzorkového pufru (2x **SB**). Směs byla 3 minuty povařena a uvolněné fosfoproteiny – eluční frakce (**EL**) byly ověřeny pomocí - 1DE.

#### **4.13.3.5. Purifikace proteinů fúzovaných s GFP značkou z bakterií *S. pneumoniae* - GFP-Trap®\_MA kit**

Kultivace s následnou izolací proteinů pro tento experiment probíhala podle standardního protokolu viz výše (4.13.3.2) pouze v přítomnosti 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub>. Na jeden vzorek bylo použito 20 µl GFP-Trap®\_MA kuliček připravených dle pokynů výrobce (Chromotek). Následně byly k tomuto množství přidány 4 mg lyzátu (**HE**), (asi 350 µl) a inkubovány 2 hodiny v chladové místnosti na rotátoru. Získané frakce během purifikace



byly opět jímány a později testovány pomocí 1-DE. Pro nás důležité, navázané, proteiny byly z imunokomplexu disociovány v 80  $\mu$ l 2x SB a povařeny 10 min při 95 °C.

Purifikační frakce byly rozděleny v 7% a 12% polyakrylamidovém gelu, obarveny pomocí CCB a zároveň použity pro imunodetekci.

#### **4.14. Manipulace s *E. coli***

##### **4.14.1. Izolace plazmidové DNA**

Pro izolaci plazmidů z buněk *E. coli* byla kultura inokulována do 10 ml LB média s antibiotikem, jehož rezistence je kódována na námi požadovaném plazmidu a inkubována přes noc za výše uvedených podmínek. Z celého objemu narostlé kultury byly izolovány plazmidy použitím soupravy QIAprep® Spin – Miniprep kit (250) podle pokynů výrobce.

Koncentrace izolované DNA byla určena spektrofotometricky měřením absorbance v ultrafialové oblasti elektromagnetického spektra při vlnové délce 260 nm použitím přístroje Du® 730 Life Sciences UV/VIS Spectrophotometer (Beckman Coulter®).

##### **4.14.2. Příprava kompetentních buněk *E. coli***

Postup pro přípravu kompetentních buněk *E. coli* (DH5 $\alpha$  a BL21).

Do 10 ml tekutého LB média s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml byly inokulovány kmeny buněk *E. coli*. Za stálého třepání (200 rpm) ponecháno růst přes noc v 37 °C. Takto narostlá kultura byla ráno očkovaná do 10 ml LB média, na O.D.<sub>600</sub> = 0,05 a nechána růst do O.D.<sub>600</sub> = 0,6. Po dosažení potřebné optické denzity byly odebrány 2 ml kultury a centrifugováno (2650 x g, 10 min., 4 °C). Oddělený supernatant (médium) byl odstraněn a peleta, obsahující buňky, byla opatrně resuspendována v 1 ml 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. Vzniklá suspenze byla centrifugována (2650 x g, 10 min, 4 °C) a oddělený pelet byl opět opatrně resuspendován v 1 ml 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. Připravené kompetentní buňky byly za neustálého chlazení po 100  $\mu$ l rozděleny do mikrozkušavek a pomocí tekutého N<sub>2</sub> rychle zamraženy a dále uchovány při teplotě -80 °C.

#### 4.14.3. Transformace plazmidové DNA do buněk *E. coli*

Ke 100  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* (BL21, DH5 $\alpha$ ) bylo přidáno 1  $\mu$ l plazmidové DNA. Opatrně promícháno a inkubováno 30 minut na ledu. Následně byly buňky vystaveny tepelnému šoku, způsobený přesunem do lázně s 42 °C na 90 vteřin. Poté byly buňky přesunuty na 90 vteřin na led. K buňkám bylo přidáno 900  $\mu$ l LB média bez antibiotik a inkubováno staticky ve vodní lázni při teplotě 37 °C, 1 hodinu. 300  $\mu$ l a 700  $\mu$ l transformovaných buněk bylo vyseto na Petriho misky s LB agarem s příslušným antibiotikem a kultivováno obvyklým způsobem.

#### 4.14.4. Exprese proteinů pod IPTG inducibilním promotorem

Příslušné kmeny *E. coli* pro expresi rekombinantních proteinů byly kultivovány v 10 ml LB média s antibiotikem, za výše uvedených podmínek kultivace (Kap. 4.12.2). Z této narostlé kultury bakterií bylo odebráno 2,5 ml a přeočkováno do 50 ml LB média s potřebným antibiotikem. Kultivace probíhala a za stálého třepání (200 rpm), při teplotě 30 °C do O.D.<sub>600</sub> = 0,6. Použitím nižší teploty byla snížena možnost ukládání nadprodukovaného proteinu do inkluzních tělísek buňky. Po dosažení této optické denzity byl z kultury odebrán vzorek (1 ml), nazývaný **před** indukci. Ihned po odebrání vzorku byl k rostoucí kultuře přidán induktor exprese (1 mM IPTG) pro zahájení exprese proteinu kódovaného na plazmidu pod IPTG inducibilním promotorem. Po přidání induktoru byly kmeny kultivovány po další 3 hodiny za stejných podmínek. Po třech hodinách byl odebrán druhý vzorek (1 ml) nazvaný **po indukci** a kultivace byla ukončena centrifugací buněk (6000 x g, 10 min., 4 °C).

Oba odebrané vzorky, před a po indukci, byly centrifugovány (18 000 x g, 3 min.) a vzniklé pelety byly resuspendovány v 50  $\mu$ l 1x SB v případě vzorku před indukci a ve 100  $\mu$ l 1x SB v případě vzorku odebraného po indukci. Takto připravené vzorky byly pro ověření výsledků indukce nanášeny po 20  $\mu$ l na dráhu 1-DE gelu. Separované proteiny byly detekovány pomocí CCB barvení.

#### 4.14.5. Izolace proteinů pomocí zařízení „French Press“

Pelet s bakteriálními buňkami, získaný viz. 4.14.4, byl resuspendován v lyzačním pufru s přidavkem inhibitoru proteáz Complete® (ředění 100x) a lysozymu (1 mg/ml) na ledu. Bakteriální buňky byly následně dezintegrovány pomocí tlaku na přístroji „**French Press**“ a vzorek byl centrifugován (10 000 x g, 20 min., 4 °C) a tím byla oddělena

rozpustná frakce **A** obsahující bílkoviny v nativním stavu, dále nazývána hrubý extrakt - **HE**, od nežádoucí nerozpustné frakce **B**, kde byly nečistoty a inkluzní tělíska.

Z každé frakce (A i B) byl odebrán kontrolní vzorek pro 1-DE. K 5  $\mu$ l frakce bylo přidáno 5  $\mu$ l 2x SB.

#### **4.14.6. Purifikace proteinů pomocí histidinové značky (His Tag)**

Bílkoviny označené histidinovou značkou byly purifikovány pomocí kolonky s „NiNTa resinem“ (Qiagen), což je komplex vázající se na histidinové zbytky, následuje-li jich v proteinové sekvenci více za sebou. Použití dle pokynů výrobce.

Do připravené kolonky, jež obsahovala resinový komplex namíchaný podle pokynů výrobce, bylo přidáno 5 ml HE. Působením gravitace kolonkou protekl lyzát. Nenavázané bílkoviny (bez histidinových zbytků) byly jímány - frakce fluát (**FL**). Resinový komplex byl dvakrát propláchnut omývacím pufrem. Jímaná oplachová frakce obsahovala zbytky nenavázaných bílkovin – oplach frakce (**W<sub>1</sub>** a **W<sub>2</sub>**). Poté bylo do kolonky pipetováno 500  $\mu$ l elučního pufru. Došlo k uvolnění bílkovin navázaných na resinový komplex a kolonkou proteklá frakce obsahovala bílkoviny, které byly značeny histidinovou značkou. Eluční proces byl opakován 2x - 3x. Od každé frakce purifikačních kroků byl odebrán vzorek pro kontrolní rozdělení proteinů v gelu a smíchán s 2x SB. Vzorky byly ředěny se SB v poměru 1:1, kromě oplachové frakce, která byla ředěna v poměru 5:1.

#### **4.14.7. Dialýza purifikovaných bílkovin**

Bílkoviny byly dialyzovány pomocí dialyzační kazety (Thermo Scientific, kat. č.: 1060) o objemu 0,5 – 3,0 ml, která byla použita dle pokynů výrobce. Dialýza probíhala v dialyzačním pufru v objemu 1 l nejprve jednu hodinu, poté byl celý objem vyměněn za čistý pufr a vzorek byl dialyzován přes noc. Další den byl pufr znovu vyměněn za čistý a dialyzován ještě další hodinu. Poté vzorek vyndán z dialyzační kazety a přidán glycerol do výsledné koncentrace 5 %. Proteinový vzorek byl pro další použití rozdělen po malých objemech a uchován v -80 °C.

## 4.15. Manipulace s DNA

### 4.15.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metody PCR bylo použito pro klonovací účely, při konstrukci expresních plazmidů, pro amplifikaci DNA fragmentů i pro jejich fúzi využitě při přípravě konstruktů a pro ověření správnosti připravených konstruktů.

Za účelem klonování, amplifikace a fúze DNA fragmentů byla použita termostabilní Phusion DNA polymeráza (NEB). Tato polymeráza je vhodná pro klonování z důvodu nízké chybovosti oproti Taq DNA polymeráze.

Pro kontrolní PCR byla použita Taq-Purple DNA polymeráza (TOP-BIO). Tomuto enzymu chybí 3'→5' exonukleázová aktivita, tudíž není schopna opravovat chyby vzniklé během amplifikace. Dochází k výskytu přibližně jedné chyby na 10<sup>5</sup> až 10<sup>6</sup> syntetizovaných bp. Její výhodou ale je její vysoká aktivita a nízká cena. Je schopná amplifikovat 1000 bp za méně než 1 min. Tato polymeráza byla použita buď přímo na izolované DNA anebo na bakteriálních koloniích, které byly do reakce přidány ve velmi malém množství. V případě koloniové PCR byl do reakce přidáván 10% Tween 20 za účelem dostatečné lýze bakteriálních buněk.

Pro klonování dlouhých úseků DNA byla použita PfuUltra High-Fidelity DNA Polymeráza (Agilent Technologies), která má ještě 6x nižší chybovost oproti Phusion DNA polymeráze.

Použité oligonukleotidy jsou shrnuty v Tab. 4, kde je uveden pracovní název oligonukleotidů, jejich sekvence a použití. Oligonukleotidy byly navrženy v programu SeqBuilder (Lasergene) a syntetizovány firmou SIGMA. Jejich teplota tání (T<sub>m</sub>) byla vypočítána dle vzorce:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ .

Podmínek amplifikace a složení reakčních směsí bylo dodržováno podle pokynů výrobce. Správnost výsledků amplifikačních reakcí byla detekována rozdělením vzorku PCR směsi v agarózovém gelu o koncentraci 0,8 – 1,2 % (dle očekávané velikosti fragmentu). Bylo-li třeba, byla úspěšnost amplifikace ověřována sekvenací.

#### **Příprava konstruktů SweetJKΔ*spr0595* pro delecí genu *spr0595***

Konstrukt *SweetJKΔspr0595*, pro delecí genu *spr0595* z chromozómu *S. pneumoniae*, o délce 4782 bp, byl složen ze Sweet Janus kazety o délce 2807 bp

nacházející se uprostřed konstruktů a po obou jejich koncových oblastech se nacházely sekvence homologní se sekvencemi přilehlých ke genu *spr0595*.

Nejprve pomocí PCR byla amplifikována Sweet Janus kazeta použitím oligonukleotidů DP1 a DP2 (Li *et al.*, 2014). Dále byly amplifikovány homologní sekvence k okolí genu *spr0595*, s použitím jako templátu chromozomální DNA divokého kmene *S. pneumoniae* Sp1, umožňující pak homologní rekombinaci do chromozómu *S. pneumoniae*. Sekvence homologní k sekvenci před genem (1022 bp) ve směru transkripce, byla amplifikována pomocí oligonukleotidů AU154 a AU155. Sekvence homologní k sekvenci za genem *spr0595* (997 bp) ve směru transkripce, pomocí oligonukleotidů AU156 a AU157.

Oligonukleotidy AU155 a AU156 byly navrženy tak, aby jejich 5' konce DNA sekvence byly homologní s počátečními sekvencemi Sweet Janus kazety, dále umožňující fúzi těchto tří fragmentů (Obr. 5b).

Po amplifikaci byly všechny tři PCR směsi rozděleny agarózovou elektroforézou, z gelu izolován proužek obsahující fragment DNA o očekávané velikosti za použití „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) a pro kontrolu velikosti byly izolované fragmenty DNA opět rozděleny v agarózovém gelu. Ověřené fragmenty – Sweet Janus kazeta a obě homologní oblasti – byly spojeny pomocí fúzní PCR použitím oligonukleotidů AU154 a AU157. Fúzní PCR směs byla opět separována v agarózovém gelu. Fúzní konstrukt o velikosti 4782 bp byl izolován z gelu a opět ověřena velikost izolovaného DNA fragmentu agarózovou elektroforézou. Následně byla změřena koncentrace DNA (31,2 ng/μl) a konstrukt byl uchován pro další použití (transformaci) v -20 °C.

### **Příprava konstruktů ΔSweetJK pro delecii Sweet Janus kazety**

Konstrukt ΔSweetJK byl složen z fúzovaných oblastí homologních k sekvencím přilehlých ke genu *spr0595*.

Pomocí PCR byly amplifikovány homologní sekvence přilehlé k okolí genu *spr0595*. Sekvence PCR produktu homologní k oblasti přilehlé před genem ve směru transkripce byla navržena tak, aby 5' konec DNA sekvence byl komplementární ke 5' konci sekvence homologní k oblasti za genem *spr0595* ve směru transkripce. Pro amplifikaci této sekvence byly použity oligonukleotidy AU157 a AU158.

Pro amplifikaci DNA fragmentu homologního k oblasti přilehlé před genem *spr0595* ve směru transkripce byly použity oligonukleotidy AU154 a AU159. Jako templát byla použita chDNA *S. pneumoniae*.

PCR směsi obsahující amplifikované fragmenty DNA byly rozděleny pomocí agarózové elektroforézy, fragmenty o očekávané velikosti byly vyříznuty a izolovány z gelu použitím „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) a pro kontrolu správnosti izolace byla ověřena velikost izolovaných fragmentů pomocí agarózové elektroforézy. Následně byla změřena koncentrace DNA amplifikovaných fragmentů. Poté byly oba fragmenty spojeny dohromady fúzí PCR.

Výsledný fragment o velikosti 1979 bp byl přečištěn přes gel („QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen)), a jeho velikost byla ověřena agarózovou elektroforézou. Vzniklý konstrukt ΔSweetJK byl uchován pro další použití (transformaci) v -20 °C.

#### **4.15.2. Cílená mutagenese**

Cílená mutagenese je PCR metoda určená k cílené mutaci DNA delecí nebo inzercí úseku DNA nebo záměnou sekvence vedoucí k záměně požadované aminokyseliny za jinou. V této práci byla cílená mutagenese použita pro přípravu vektoru nesoucí fosfoablativní záměnu, kde byla zaměněna aminokyselina treonin za alanin. Pro cílenou mutagenesi byla použita komerční souprava QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) podle pokynů výrobce. Během PCR reakce byly amplifikovány obě vlákna plazmidu pomocí navržených oligonukleotidů s požadovanou mutací (viz. Tab. 4). Výsledná amplifikační směs byla štěpena *DpnI* restriční endonukleázou (NEB), která degraduje mateřská metylovaná vlákna, tedy původní nemutované kopie DNA metylované v *E. coli* a v roztoku tak zůstávají pouze mutované molekuly DNA. Takto připravený mutovaný plazmid byl transformován do *E. coli* a přítomnost aminokyselinové záměny byla ověřena sekvenací.

#### **4.15.3. Štěpení DNA restričními endonukleázami**

Restriční endonukleázy jsou enzymy navržené tak, aby rozpoznaly specifickou sekvenci na DNA, ve které dojde k přesnému štěpení. Ke štěpení dochází na obou řetězcích DNA najednou v místě vazby deoxyribózy a fosfátového zbytku. Tím vzniknou fragmenty o definované velikosti s definovanými konci. Enzymy byly používány dle pokynů výrobce (New England Biolabs). V případě potřeby byla pak reakční směs

rozdělena agarózovou elektroforézou pro kontrolu štěpení nebo pro izolaci DNA (viz. 4.15.5).

#### **4.15.4. Agarózová elektroforéza DNA**

Pro rozdělení fragmentů DNA o rozdílné velikosti, byla využita elektroforetická metoda rozdělení v agarózovém gelu. Princip této metody je založen na rozdílné pohyblivosti různě velkých fragmentů DNA ve stejnosměrném elektrickém poli. Podle očekávané velikosti byla volena i koncentrace použitého gelu 0,8 % – 1,2 %. Gel byl složen z agarózy (SIGMA) rozpuštěné v TAE pufru. Pro zviditelnění fragmentů DNA pod UV světlem bylo do gelu přidáno barvivo GelRed (Biotium, kat.č. 41003-1). Před nanesením na gel byly vzorky smíchány s 6x Loading Dye (Thermo Scientific). Paralelně se vzorky byl na gel nanášen i DNA standart GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific; kat.č.: SM1331). Elektroforéza probíhala v TAE pufru při napětí 90 V 1 hodinu na přístroji OWL EASYCAST™ B1A (ThermoScientific). Výsledek separace, elektroforetogram, byl vizualizován UV světlem a digitalizován CCD kamerou na aparatuře IN Genius Syngene bioimaging pomocí softwaru GeneTools (SynGene).

#### **4.15.5. Izolace DNA z gelu**

Proběhlá PCR reakce může obsahovat různě velké fragmenty. Chceme-li izolovat PCR fragment o specifické velikosti, bylo třeba celý objem této PCR směsi nejprve rozdělit podle velikosti pomocí agarózové elektroforézy. Potřebné úseky DNA byly z gelu vyříznuty za podsvícení UV světlem do předem zvážené mikrozkušavky. DNA poté byla z vyříznuté části gelu izolována pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Kit byl použit podle pokynů výrobce. Správnost izolované DNA z gelu byla ověřena opět agarózovou elektroforézou.

### **4.16. Manipulace s proteiny**

#### **4.16.1. Stanovení koncentrace bílkovin pomocí BCA**

Ke stanovení koncentrace proteinů byla použita souprava Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) podle pokynů výrobce.

#### **4.16.2. Kinázová reakce *in vitro***

Během kinázové reakce dochází k přenosu fosfátových skupin (fosforylaci) z donoru, kterým je v našem případě kinázová doména StkP, na substrát – protein FtsA. Byly připraveny kinázové reakce obsahující kombinaci proteinů FtsA s StkP-KD a FtsA-T404A s StkP-KD. Reakce probíhaly v kinázovém pufru (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 μM ATP, pH 7,5), v celkovém objemu 20 μl. Start reakcí byl zahájen přidáním ATP, reakce samotné probíhaly ve 37 °C po dobu 15 min a byly zastaveny buď přidáním 5x SB - příprava vzorků pro 1-DE (viz. 4.16.4) nebo přidáním 6% TCA - příprava vzorků pro 2-DE (viz. 4.16.3). Jako negativní kontrola byl použit substrát (FtsA/FtsA-T404A) bez StkP-KD. Autofosforylační aktivita kinázy byla testována samotnou StkP-KD bez přídavku substrátu.

#### **4.16.3. Srážení proteinů**

Účelem sražení proteinů bylo přečistění a zakoncetrování vzorku. Pro srážení bílkovin byla použita TCA o finální koncentraci 6 % v kombinaci s acetonem. Srážení probíhalo 1 hodinu na ledu. Bylo ukončeno centrifugací (14 000 x g, 15 min při laboratorní teplotě). Následoval jemný oplach pelety acetonem od zbytků TCA. Vzorek byl opětovně stočen a získaná peleta byla resuspendována v příslušném pufru či přímo v lyzačním pufru na 2-DE. Vzorek bylo možné dlouhodobě uchovat při -80 °C.

#### **4.16.4. 1-D polyakrylamidová elektroforéza (1-DE)**

K separaci bílkovin byla použita metoda polyakrylamidové gelové elektroforézy. Bílkoviny byly děleny v elektrickém poli podle molekulové hmotnosti, v přítomnosti SDS. Vzorky byly rozpuštěny v SDS-PAGE vzorkovém pufru (SB) a proteiny denaturovány povařením po dobu 5 min. při teplotě 99 °C. Takto připravené vzorky byly nanášeny na dráhy polyakrylamidového gelu o různé koncentraci 7% - 20% nebo uchovány pro další použití v -20 °C. Pro separaci byla použita malá či střední velikost gelu (aparatura ATTO). Paralelně se vzorky byl na gel nanášen proteinový standard molekulových hmotností 11 - 245 kDa (BioLabs, kat.č.: P7712L). Nastavení elektroforézy probíhalo dle manuálu. Pro střední gely byl volen proud 40 mA na 1 gel.



#### 4.16.4.1. Složení gelů pro 1-DE

Pro rozlišení požadovaného spektra bílkovin byly použity akrylamidové gely o koncentraci 7 %, 9 %, 12 % a 20 %. Koncentrace akrylamidu v zaostřovacím gelu byla pokaždé 4 %. Pro lepší rozlišení a zaostření proteinů v oblasti vysokých molekulových hmotností byl použit 7% separační gel. Pro rozlišení bílkovin o nižší molekulové hmotnosti byl použit 20% separační gel.

- 1 separační gel (20 ml), složení:

koncentrace	20%	12%	9%	7%
30% Akrylamid	13,3 ml	8 ml	6 ml	4,7 ml
1,5 M Tris-base; pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
10% SDS	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
10% APS	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1,3 ml	6,6 ml	8,6 ml	8,2 ml
Objem	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml

- zaostřovací gel (6 ml, 4%), složení:

30% Akrylamid	800 $\mu$ l
0,5 M Tris-base; pH 8,8	1,5 ml
10% SDS	60 $\mu$ l
10% APS	60 $\mu$ l
TEMED	7,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3,6 ml
Objem	6 ml

#### 4.16.5. 2-D elektroforéza

Principem 2-D SDS-PAGE (2-DE) je rozdělení proteinů ve dvou rozměrech – dle hodnoty izoelektrického bodu (pI) bílkoviny a poté dle její molekulové hmotnosti.

Připravovaný vzorek bylo potřeba před vlastní analýzou přechistit a zakonzentrovat. Bylo použito srážení pomocí 6% TCA/acetone (Kap. 4.16.3). Získaná peleta obsahující proteiny byla následně rozpuštěna ve 400  $\mu$ l lyzačního pufru pro 2-DE.

Pro dělení v prvním rozměru byl použit Imobiline<sup>TM</sup> Dry Strip (IPG strip); pH 4-7, (GE Healthcare), o délce 18 cm. Nanášení vzorku na strip probíhalo pomocí rehydratace přes noc. Následná izoelektrická fokusace probíhala na zařízeních Multiphor II system (GE Healthcare), 54 kVh s maximem 3500 V během asi 26 hodin. Stripy bylo možno po proběhlé fokusaci v případě potřeby zamrazit při -20 °C.

Dle výběru aparatury pro druhý rozměr mohl být strip i za cenu ztráty bazických či kyselých bílkovin zkrácen. Strip byl po fokusaci ekvilibrován v ekvilibračním pufru s čerstvým přídatkem DTT (20 mg/ml) po dobu 10 min a poté s přídatkem IAA (25 mg/ml) a bromfenolovou modří také po dobu 10 min.

Po ekvilibraci byly stripy umístěny na začátek SDS-PAGE gelu pro II. rozměr a následovala vlastní elektroforéza na zařízeních Oxford Glycosystem investigator - velký typ gelů (22 x 22 cm) či ATTO – střední velikost gelů (14 x 14 cm). Separace probíhala na 10% či 12% gelech. Podrobnější info viz. Manuál: 2-D electrophoresis Principles and Methods (GE Healthcare). Paralelně se vzorky byl nanesen i standard molekulových hmotností (BioLabs; kat. č.: P7712S).

#### **4.16.6. Přenos proteinů na PVDF membránu (Western blot)**

Aby bylo možné bílkoviny rozdělené v gelu detekovat specifickou protilátkou, bylo třeba je přenést na PVDF (polyvinylidendifluorid) membránu Immobilon®-P (Millipore). Membrána byla před použitím smočena v metanolu a opláchnuta 1x blotovacím puftrem. Gel byl založen do blotovacího sendviče. Přenos bílkovin probíhal mokřím elektroblotem, v blotovacím pufru, v zařízení od firmy Labnet (360 mA, 30 min.).

#### **4.16.7. Detekce bílkovin**

V rámci této diplomové práce byly použity 2 techniky detekce proteinů. Proteiny separované v gelu byly vizualizovány barvením SDS-PAGE gelu v koloidní Coomassie Blue, nebo byly bílkoviny přeneseny na membránu a detekovány pomocí specifických protilátek - imunodetekce.

##### **4.16.7.1. Detekce proteinů koloidní Coomassie Blue**

Barvení pomocí „Colloidal Coomassie Blue“ (CCB) bylo voleno při barvení 1-DE a 2-DE gelů. Před barvením byl gel opláchnut 3 x 10 min v deionizované vodě a až poté byl vložen do barvy. Barvení gelů probíhalo přes noc za mírného kývání při pokojové teplotě. Gel byl odbarvován v deionizované vodě za mírného kývání při pokojové teplotě do odbarvení pozadí. Pro lepší odbarvení byl gel ponechán v dH<sub>2</sub>O přes noc v chladové místnosti.

Gely byly digitálně archivovány použitím scanneru EPSON EXPRESSION 10000 XL. Originály byly uchovány v chladové místnosti v 1% kyselině octové.

#### **4.16.7.2. Imunodetekce**

Proteiny přenesené na PVDF membránu je možné detekovat specifickými protilátkami. Jednotlivé kroky imunodetekce a použití protilátek jsou shrnuty v Tab. 5.

Primární protilátky byly ředěny v 1% BSA/TBS-T pufru, sekundární v TBS-T pufru. Blokování membrány probíhalo v 5% BSA/TBS-T pufru. Po každé inkubaci membrány v protilátce (mezi kroky 2-3; 3-4) byla membrána opláchnuta 3 x 10 min. v TBS-T pufru. Po posledním oplachu (po kroku 3) byla membrána lehce osušena a na stranu s proteiny byl nanesen substrát (typ substrátu a délka inkubace uvedeny v Tab. 5) pro vyvolání chemiluminiscenčního signálu. Oba používané chemiluminiscenční substráty SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific); kat. č. 34080 a WesternBright Sirius HRP substrate (Advanta); kat.č. K-12043-D10) se liší svojí citlivostí detekce. Poté byla membrána vložena do folie a imunodetekce byla vizualizována pomocí aparatury G:Box Chemi XRQ instrument (SynGene). Nebo byla membrána vložena do vyvolávací kazety BAS Imaging Plate (Fujifilm) a pro zachycení signálu byly použity rentgenové filmy.

detekce		P-Thr	P-Thr	FtsA	StkP
krok č. 1	blok	30 min/RT	30 min/RT	ON/CR;(1 h/RT)	30 min/RT
krok č. 2	primární protilátka	anti-P-Thr 1:50 000, ON/CR	anti-P-Thr 1:2000, ON/CR	anti-FtsA 1:20 000, 1 h/RT; (ON/CR)	anti-StkP 1:50 000, 1 h/RT
krok č. 3	sekundární protilátka	anti-Rabbit 1:5000, 1 h/RT	anti-Rabbit 1:2000, 1 h/RT	anti-Rabbit 1:10 000, 1 h/RT	anti-Rabbit 1:10 000, 1 h/RT
krok č. 4	substrát (délka inkubace substrátu)	West Femto (2 min.)	West Pico (5 min.)	West Pico (5 min.) West Femto (2 min.)	West Pico (5 min.)

**Tab. 5. Postup při imunodetekci.** V tabulce jsou uvedeny podmínky promývání PVDF membrány v: blokovacím pufru (5% BSA); primární a sekundární protilátce – uvedeno ředění protilátek, podmínky použití a použitý substrát – West Pico - SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific), West Femto - WesternBright ECL HRP substrate (Advanta). Pro každý substrát uvedena délka inkubace. RT – pokojová teplota, CR – chladová místnost, ON – přes noc.

#### 4.16.7.3. Kvantifikace fosforylace proteinů

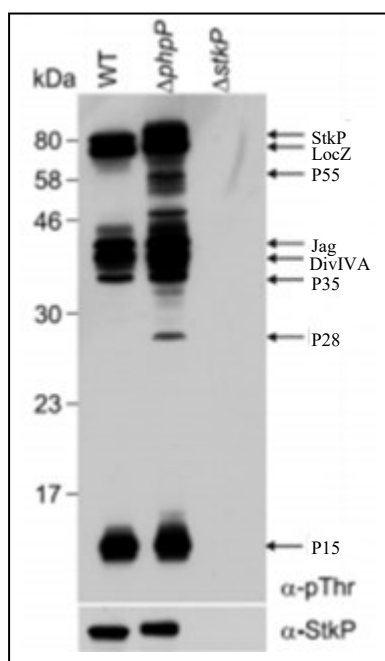
Za účelem kvantifikace fosforylace proteinů byly imunoblotty vyvolány použitím G:Box Chemi XRQ dokumentačního systému. Získaný signál byl kvantifikován softwarem Quantity One (BioRad) nebo programem Gene tools (SynGene). Hodnoty byly normalizovány k celkovému množství proteinu. Statisticky významná hladina difference byla stanovena na  $p \leq 0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Analýza fosfoproteomu *S. pneumoniae* zaměřená na identifikaci nízkomolekulárního proteinu P15

V rámci diplomové práce jsme se zaměřili na studium funkčních partnerů signalizační dráhy StkP/PhpP u *S. pneumoniae*. Fosfoproteom bakterie závislý na přítomnosti kinázy StkP a detekovaný pomocí anti-P-Thr protilátky byl částečně již v naší laboratoři studován (Nováková *et al.*, 2010; Ulrych *et al.*, 2016). V mutantních kmenech, kde byla vyřazena funkce fosfatázy PhpP a fosforylační signál byl tím značně zesílen, byla identifikována řada membránových proteinů jako LocZ, Jag, DivIVA (Obr.1). Nicméně, jak je ukázáno na Obr.1, část proteinů označených pouze číslem (P55, P35, P28, P15) zůstala stále neidentifikována. Jedním z cílů této diplomové práce bylo identifikovat nový substrát StkP kinázy v oblasti kolem 15 kDa označený jako P15.

Předchozí experimenty, které byly založeny na obohacení fosforylovaných proteinů pomocí  $\text{TiO}_2$  kolonek nevedly k uspokojivé identifikaci proteinu P15, proto v rámci této práce byla zvolena metoda obohacení fosfoproteomu na bázi afinitní chromatografie - imunoprecipitace, kde byla použita protilátka proti fosfo-Thr (Polyklonální králičí P-Thr protilátka imobilizovaná na magnetických kuličkách, cell signalling), která byla imobilizována na magnetických kuličkách.

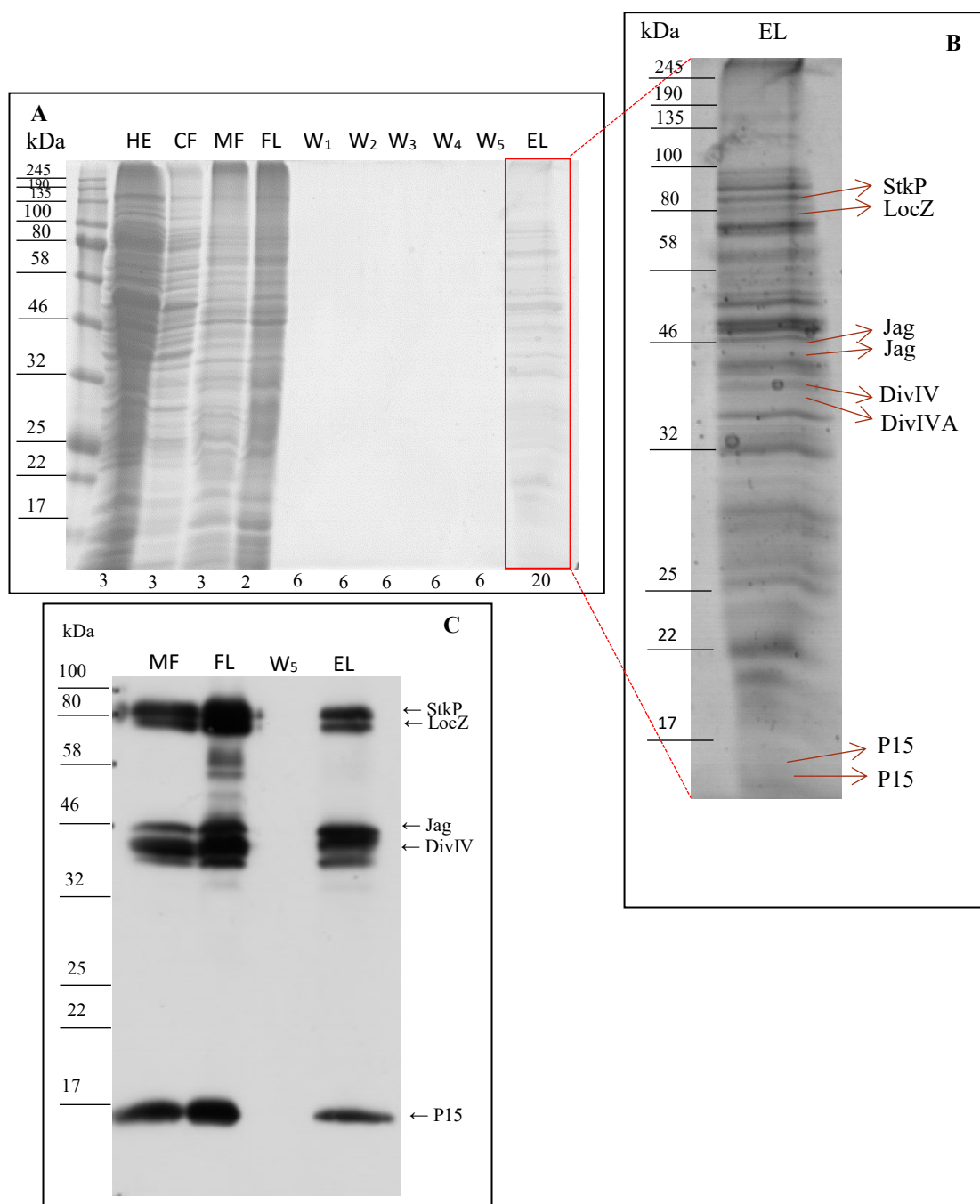


**Obr. 1. Fosfoproteinový profil MF *S. pneumoniae*.** Zleva: standard molekulových hmotností v kDa; Membránové frakce divokého (*WT*) kmene; kmene  $\Delta\text{phpP}$  (Sp113); kmene  $\Delta\text{stkP}$  (Sp10). Byla provedena imunodetekce pomocí anti-P-Thr a anti-StkP protilátek. Převzato z Ulrych *et al.*, 2016.

Vzhledem k tomu, že se jedná o membránové proteiny (Nováková *et al.*, 2010), byly experimenty zacíleny na membránovou frakci *S. pneumoniae*, která byla připravena dle standardního protokolu (viz Kap.4.13.3.4).

Pro detekci, co možná nejvyšší intenzity fosforylovaných bílkovin závislých na kináze StkP, byl použit mutantní kmen Sp113 s delecí v genu pro fosfatázu *phpP*, u kterého nedochází k defosforylaci bílkovin fosforylovaných jeho funkčním partnerem kinázou StkP. Účinek fosforylace je tak výraznější a delší (Obr. 1). Pro další zvýšení účinku fosforylace kinázou byly buňky kultivovány v přítomnosti ampicilinu (0,66 µl/ml). Ampicilin zvyšuje fosforylační aktivitu StkP kinázy (Beilharz *et al.*, 2012).

Bakteriální lyzát – hrubý extrakt (**HE**), membránová frakce (**MF**) a cytoplazmatická frakce (**CF**) byly separovány pomocí jednorozměrné elektroforézy (**1-DE**) v polyakrylamidovém gelu o vyšší koncentraci akrylamidu (12% a 20%) s cílem lepší detekce proteinů o nižší molekulové hmotnosti. Získaný 1-DE proteom je znázorněn na Obr. 2A. Proteinová frakce, která se nenavázala na anti-P-Thr imobilizovanou protilátku, protekla kolonkou – fluát (**FL**), se zdála být svým spektrem bílkovin velmi podobná výchozí MF, srovnatelné i přes jinou nanášku bílkovin MF a FL frakce. V eluční frakci (**EL**) byly detekovány proteiny, které se navázaly na anti-P-Thr imobilizovanou protilátku (Obr. 2A, B). Z P-Thr imunodetekce je patrné, že fosforylační profil získaný imunoprecipitací je totožný s fosforylačním profilem MF. EL obsahuje, kromě již známých substrátů StkP kinázy (LocZ, DivIVA a Jag) a samotné kinázy, také právě fosforylovaný neznámý protein P15.



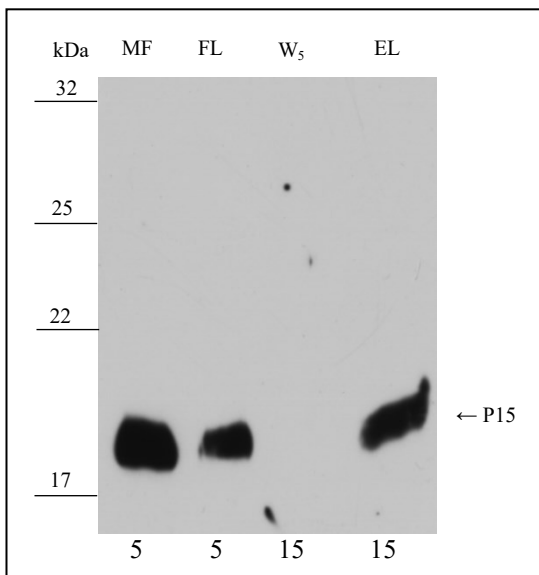
**Obr. 2. Imunoprecipitace membránových proteinů z kmene *Sp113 (AphP)* pomocí anti-P-Thr imobilizované protilátky (1-DE, 12% gel, barveno CCB). Množství nanášek v  $\mu$ l uvedeno pod obrázkem. Vlevo standard molekulových hmotností v kDa; bakteriální lyzát (HE); cytoplazmatická frakce (CF) a membránová frakce (MF), která byla inkubována s kuličkami s navázanou anti-P-Thr protilátkou; fluát (FL) – frakce proteinů, která nezůstala navázána na magnetických kuličkách; oplachové frakce 1-5 (W<sub>1</sub>-W<sub>5</sub>) – oplach kuliček; eluát (EL) – frakce s navázanými bílkovinami na kuličkách.**

**Obr. 2A.** – Barvení CCB

**Obr. 2B.** – Výřez EL frakce z gelu z Obr. 2A - graficky upraveno (kontrast) a znázorněny proteiny, které byly detekovány anti-P-Thr protilátkou po vyřezání proužků a rozdělení pomocí 1-DE (data neuvedena)

**Obr. 2C.** – P-Thr imunodetekce purifikačních kroků při obohacení fosfoproteomu: MF, FL, W<sub>5</sub> a EL.

Za účelem, co možná nejpřesnější lokalizace a dostatečné separace proteinu P15 od okolních bílkovin byly po imunoprecipitaci bílkoviny rozděleny na 20% akrylamidové gelu, což umožnilo snadnější vyřezání proužků nízkomolekulárních bílkovin pro následnou MS analýzu. Paralelně byla lokalizace P15 upřesněna i imunodetekcí pomocí anti-P-Thr protilátky (Obr. 3).

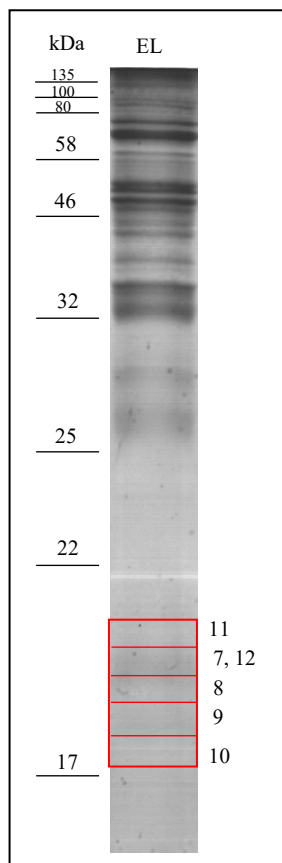


**Obr. 3. Imunoprecipitace membránových proteinů z kmene Sp113 (*ΔphpP*) pomocí anti-P-Thr imobilizované protilátky – výřez gelu (1-DE, 20% gel). Zleva: standard molekulových hmotností v kDa; Uvedené frakce: MF, FL, W<sub>5</sub>, EL. Množství nanášky v µl uvedeno pod obrázkem.**

Z Obr. 3 je patrné, že protein P15 na 20% gelu migruje mezi standardy molekulových hmotností 17-22 kDa. Ze stejného připraveného gelu, který byl obarven CCB, byla vyřezána celá řada po sobě jdoucích proužků v oblasti mezi standardy molekulových hmotností 17-22 kDa (Obr. 4). Vyřezané proužky gelu obsahující separované proteiny byly použity na identifikaci proteinů v servisní laboratoři pomocí metody hmotnostní spektrometrie (MS MALDI TOF). Vzorky na MS analýzu byly připraveny ze dvou nezávislých 20% gelů. Všechny identifikované bílkoviny jsou uvedeny v Tab. 6.

Dle předešlých experimentů bylo předpokládáno, že protein P15 se s největší pravděpodobností nachází v proužku 7, 12 či 11 a právě v těchto proužcích byl identifikován protein Spr0595 (Rhodanáza = thiosulfát sulfurtransferáza).





**Obr. 4. Separace EL frakce *S. pneumoniae* pomocí 1-DE (20% gel, barven CCB). Eluční frakce *S. pneumoniae* kmene Sp113. V obrázku jsou červeně vyznačeny vybrané proteinové proužky na identifikaci pomocí MALDI TOF, vyřezávané z oblasti mezi 17-22 kDa podle anti-P-Thr imunoblotu. Proužek 12 byl vyříznut z paralelního gelu. Výsledky identifikace bílkovin uvedeny v Tab. 6.**

Dalším možným kandidátem na substrát P15 by mohla být  $\beta$  podjednotka ATP syntázy identifikovaná v proužku 11, která je podjednotkou enzymu zajišťující pro buňku energii v podobě ATP.

Kromě proteinu Spr0595 a  $\beta$  podjednotky ATP syntázy byly v analyzovaných proužcích gelu identifikovány tři ribozomální proteiny (L13, L17 a L19), které jsou součástí 50S ribozomální podjednotky a jeden S5 protein, který je součástí 30S podjednotky. V proužku č. 9 byla nalezena pouze kontaminace proteinem BSA a v proužku číslo 10 nebyl identifikován žádný protein.

č. proužku	protein	DTB č.	počet peptidů	pokrytí [%]	MS/MS	MW	pI
7	50S ribosomální protein L19 ( <i>spr1171</i> )	RL19_STRP2	4	43	IFPIHTPR IQIFEGVVIAR	13	10.9
	„rhodanese domain protein“ ( <i>spr0595</i> )	395597928	3	19	-----	14	10.8
	50S ribosomální protein L17 ( <i>spr0216</i> )	RL17_STRP2	2	20	-----	15	9.9
12	„rhodanese domain protein“ ( <i>spr0595</i> )	395597928	3	19	DKPVLLYENQR IVDNEEFELIR	14	10.8
	50S ribosomální protein L17 ( <i>spr0216</i> )	RL17_STRP2	2	20	DLTTDLLINESIV TTEAR	15	9.9
	50S ribosomální protein L19 ( <i>spr1171</i> )	RL19_STRP2	3	36	-----	13	10.9
8	50S ribosomální protein L19 ( <i>spr1171</i> )	RL19_STRP2	4	43	IQIFEGVVIAR	13	10.9
9	BSA kontaminace	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	30S ribosomální protein S5 ( <i>spr0206</i> )	RS5_STRP2	4	34	FAALVVVDHN GR VLLKPAVEGSGV AAGGAVR	17	9.5
	ATP syntáza podj. b ( <i>spr1364</i> )	ATPF_STRP2	1	7	FAWSNITGIFEE R	18	5.3
	„rhodanese domain protein“ ( <i>spr0595</i> )	395597928	2	18	IVDNEEFELIR	14	10.8
	ribosomální protein L13 ( <i>spr0271</i> )	353855684	3	17	WYVVDATDVPL GR	15	9.8

**Tab. 6. Výsledky identifikace proteinů imunoprecipitovaných anti-P-Thr imobilizovanou protilátkou u *S. pneumoniae* kmene Sp113 pomocí MALDI TOF analýzy.** Číslo proužku koresponduje s popisem na Obr. 4. U každého proteinového proužku je uveden název identifikovaných bílkovin s označením v databázi SwissProt, počet detekovaných peptidů, procento pokrytí sekvence proteinu, sekvence aminokyselin identifikovaného peptidu, teoretické hodnoty molekulové hmotnosti (v tis.) a izoelektrický bod (pI) dané bílkoviny.

#### 5.1.1. Ověření rhodanázy (Spr0595) jako substrátu proteinkinázy StkP

Vzhledem k tomu, že protein Spr0595 byl i v předešlých úvodních experimentech určen jako kandidát na protein P15 a také proto, že homologní geny ke genu *spr0595* nejsou u *E. coli* esenciální (Cheng *et al.*, 2008), a tedy se dá předpokládat, že ani u *S. pneumoniae* nebude *spr0595* esenciální, rozhodli jsme se zaměřit na studium proteinu Spr0595 jako potenciálního substrátu P15. Pro potvrzení, zda protein Spr0595

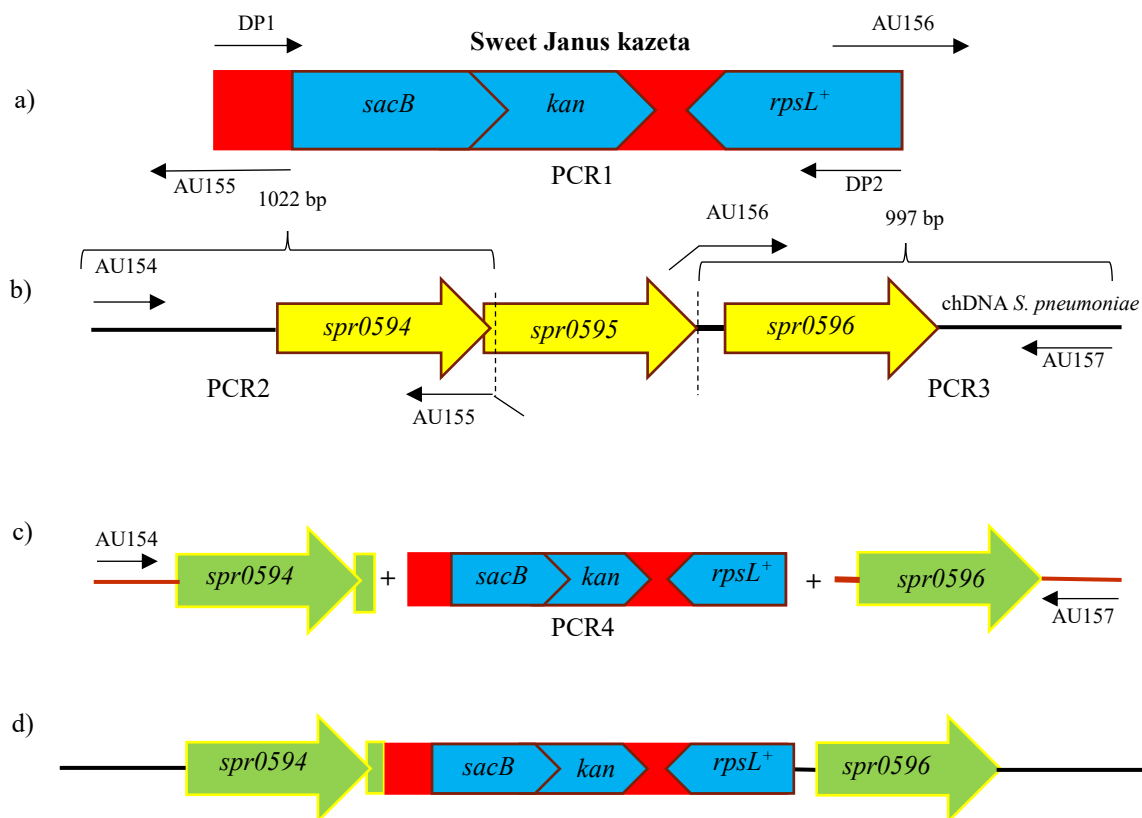
skutečně odpovídá fosforylovanému proteinu P15 a je možným substrátem kinázy StkP, byl připraven deleční kmen v genu *spr0595* a porovnán jeho fosforylovaný profil s divokým kmenem, a to na pozadí dvou divokých kmenů *S. pneumoniae* Rx a R6. Pokud by v delečním mutantním kmeni došlo ke ztrátě fosforylace v dané oblasti na gelu v porovnání s divokým typem, jednalo by se skutečně o fosforylovaný substrát proteinkinázy StkP.

#### 5.1.1.1. Příprava delečního kmene *S. pneumoniae* pro delecí genu *spr0595*

#### 5.1.1.2. Příprava delečního konstruktů *spr0595::SweetJanus*

Pro přípravu delečního konstruktů pro delecí genu *spr0595* byl použit lineární DNA konstrukt o délce 2807 bp nazývaný Sweet Janus kazeta (Li *et al.*, 2014). Tato kazeta nese gen *sacB* (gen pocházející z *Bacillus subtilis*) udělující senzitivitu k sacharóze (přítomnost genu v bakterii vede v přítomnosti cukru sacharózy v médiu k buněčné smrti), gen *kan* kódující rezistenci ke kanamycinu a dominantní alelu genu *rpsL*, udělující buňce senzitivitu ke streptomycinu (k tomuto antibiotiku je divoký kmen *S. pneumoniae* rezistentní).

V první fázi experimentu bylo potřeba pomocí fúzní PCR získat konstrukt obsahující Sweet Janus kazetu uprostřed a po obou stranách dvě oblasti, které jsou homologní k oblastem obklopujícím gen *spr0595*. Takto připravený konstrukt pak pomocí homologní rekombinace umožnil vložení Sweet Janus kazety na určené místo na chromozómu. Grafický postup přípravy delečního konstruktů je zobrazen na Obr. 5. Do reakce byly použity 3 PCR fragmenty obsahující oblast **před genem**, tj. část genu *spr0593* a celý gen *spr0594*; oligonukleotidy: AU154, AU155 determinující fragment PCR 2 (1022 bp) a oblast **za genem** (část genu *spr0597* a celý gen *spr0596*; oligonukleotidy: AU156, AU157 determinující fragment PCR 3 (997 bp) (Obr. 5b). Třetím fragmentem byla Sweet Janus kazeta (oligonukleotidy: DP1 a DP2) (Obr. 5a). Všechny tři fragmenty byly smíchány v ekvimolárním množství a pomocí krajních oligonukleotidů (AU154 a AU157) byl amplifikován fúzní fragment o délce 4782 bp a byl pojmenován *spr0595::SweetJanus*. Výsledný fúzní PCR produkt byl ověřen pomocí DNA agarózové elektroforézy.

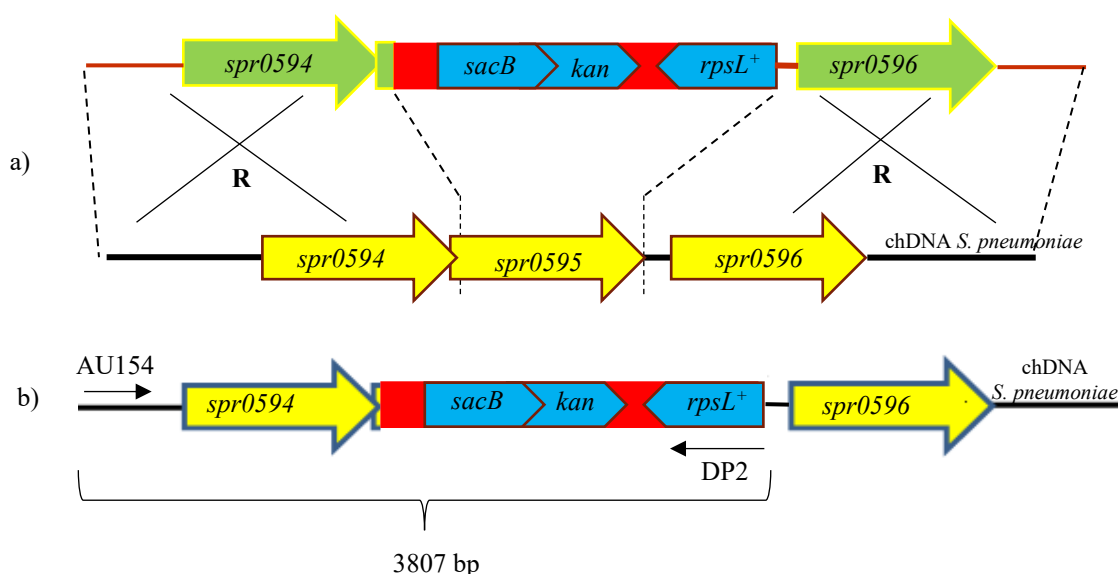


**Obr. 5. Schéma přípravy konstruktů pro delecí genu *spr0595* u *S. pneumoniae*.**

- a) Sweet Janus kazeta (2807 bp) amplifikovaná pomocí oligonukleotidů DP1 a DP2 (konstrukt PCR1). Nese geny: *sacB* – senzitivita k sacharóze; *kan* – rezistence ke kanamycinu; *rpsL<sup>+</sup>* – senzitivita ke streptomycinu.
- b) Znárodnění amplifikace obou fragmentů homologních k přilehlému okolí genu *spr0595*. Oligonukleotidy AU154 a AU155 byly použité pro amplifikaci fragmentu PCR2 o velikosti fragmentu 1022 bp. Oligonukleotidy AU156 a AU157 pro amplifikaci fragmentu PCR3 o velikost fragmentu 997 bp.
- c) Fúzní PCR (PCR4) všech tří fragmentů pomocí oligonukleotidů AU154 a AU157. Zeleně jsou označeny oblasti homologní s *chDNA S. pneumoniae*.
- d) Výsledný delecí konstruktu použitý pro delecí genu *spr0595* (4782 bp). Nese oblasti DNA přilehlé ke genu *spr0595* a Sweet Janus kazetu. Zeleně jsou označeny oblasti homologní s *chDNA S. pneumoniae*.

### 5.1.1.3. Transformace *S. pneumoniae* delečním konstruktem *spr0595::SweetJanus*

Konstrukt *spr0595::SweetJanus* byl transformován do divokých kmenů *S. pneumoniae* **Rx** (Sp1) a **R6** (Sp208). Výsledkem transformace a následné homologní rekombinace bylo odstranění genu *spr0595* a vložení Sweet Janus kazety do chromozómu *S. pneumoniae*. Transformované kmeny byly selektovány na krevních agarech na kanamycinovou rezistenci a senzitivitu k sacharóze. Schéma delece genu *spr0595* je zobrazeno na Obr. 6.



Obr. 6. Schéma delece genu *spr0595* pomocí konstruktu *spr0595::SweetJanus*.

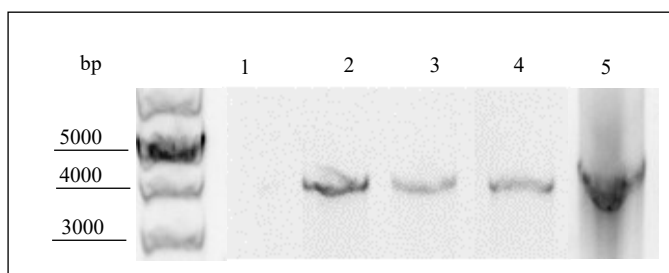
- a) Deleční konstrukt *spr0595::SweetJanus*. Uprostřed je Sweet Janus kazeta nesoucí geny: *sacB* – senzitivita k sacharóze; *kan* – rezistence ke kanamycinu; *rpsL<sup>+</sup>* – senzitivita ke streptomycinu. Zeleně jsou označeny homologní oblasti k okolí genu *spr0595*.

Uspořádání genů v okolí genu *spr0595* na chromozomální DNA *S. pneumoniae* je znázorněno žlutě. **R** – sekvence zajišťující homologní rekombinaci mezi delečním konstruktem a chDNA.

- b) Výsledná rekombinantní chDNA *S. pneumoniae*. Gen *spr0595* byl odstraněn a nahrazen Sweet Janus kazetou. Oligonukleotidy AU154 a DP2 byly použity pro ověření úspěšnosti rekombinace pomocí koloniové PCR. Vznikl produkt o předpokládané velikosti 3807 bp.

Vzniklé mutantní kmeny byly pojmenovány **Sp346** (Rx  $\Delta$ *spr0595::Sweet Janus*) a **Sp347** (R6  $\Delta$ *spr0595::Sweet Janus*). Správnost delece genu *spr0595* a integrace Sweet Janus kazety byla otestována pomocí koloniové PCR (Obr. 7), použitím oligonukleotidů AU154 a DP2 (Obr. 6b), které jsou komplementární se sekvencí na chromozómu před Sweet Janus kazetou ve směru transkripce (v genu *spr0593*) a se sekvencí části *rpsL*

genu Sweet Janus kazety. Tímto vznikl fragment PCR o předpokládané velikosti 3807 bp (Obr. 7- dráhy č. 2, 3, 4), což znamená, že všechny testované klony byly pozitivní. Jako pozitivní kontrola byla provedena PCR amplifikace na delečním konstrukt *spr0595::SweetJanus* (Obr. 7- dráha č. 5). Kmen Sp1, použitý jako negativní kontrola, nemá ve svém chromozómu integrovanou Sweet Janus kazetu a nedošlo tedy k žádné amplifikaci (Obr. 7- dráha č. 1).

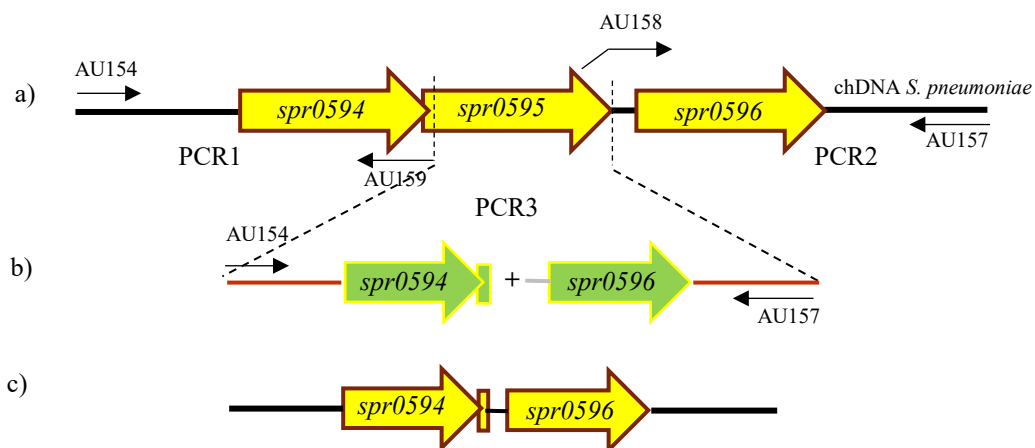


**Obr. 7. Výřez elektroforetogramu koloniové PCR.** Ve dráhách 2-5 byl detekován PCR produkt o předpokládané velikosti 3800 bp.

- 1- Kmen Sp1 - negativní kontrola
- 2- Kmen Sp346 (Rx  $\Delta spr0595::Sweet Janus$ )
- 3- Kmen Sp347 klon A (R6  $\Delta spr0595::Sweet Janus$ )
- 4- Kmen Sp347 klon B (R6  $\Delta spr0595::Sweet Janus$ )
- 5- Deleční konstrukt *spr0595::SweetJanus* - pozitivní kontrola.

#### 5.1.1.4. Příprava konstrukt *$\Delta spr0595k$*

Pro získání neznačeného delečního kmene v genu *spr0595*, tzn. s odstraněnou kazetou Sweet Janus, byl připraven pomocí fúzní PCR konstrukt  *$\Delta spr0595$*  (Obr. 8c) určený pro delecí Sweet Janus kazety z kmenů Sp346 a Sp347. Konstrukt  *$\Delta spr0595$*  se skládá ze dvou fragmentů DNA homologních k přilehlému okolí genu *spr0595* (Obr. 8b - zeleně označené oblasti DNA). Tento konstrukt byl pojmenován  *$\Delta spr0595k$* . Jednotlivé fragmenty konstrukt byly amplifikovány samostatně za použití oligonukleotidů AU154 a AU159 (Obr. 8a, PCR1) a oligonukleotidů AU158 a AU157 (Obr.8a, PCR2) a následně spojeny dohromady pomocí fúzní PCR (Obr.8b, PCR3) za použití oligonukleotidů AU154 a AU157. Velikost výsledného fragmentu byla 1974 bp. Správnost přípravy delečního konstrukt  *$\Delta spr0595k$*  byla ověřena elektroforézou v agarózovém gelu.

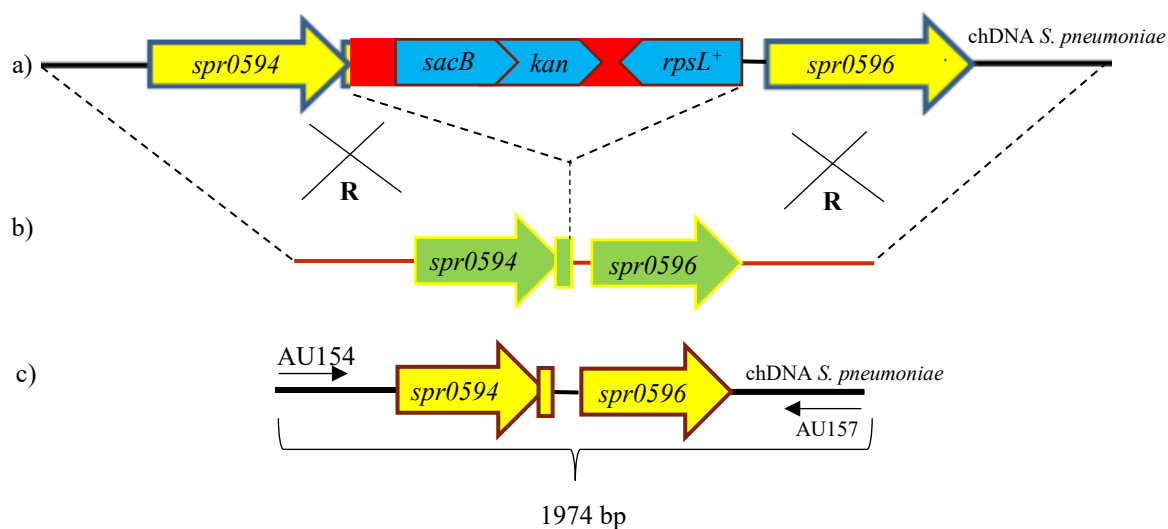


Obr. 8. Schéma přípravy delečního konstrukt  $\Delta spr0595$  pro delecí Sweet Janus kazety.

- Chromozomální DNA *S. pneumoniae* v oblasti kolem genu *spr0595*. Oligonukleotidy AU154 a AU159 byly použity pro amplifikaci fragmentu o vel. 1022 bp, ležícího před genem *spr0595* (PCR1) ve směru transkripce. Oligonukleotidy AU158 a AU157 byly použity k amplifikaci druhého homologního fragmentu o vel. 997 bp, ležícího za genem *spr0595* (PCR2) ve směru transkripce.
- Fúzní PCR (PCR3) dvou samostatně amplifikovaných úseků homologních k přilehlému okolí genu *spr0595*. AU154 a AU157 jsou oligonukleotidy použité při fúzi těchto dvou fragmentů.
- Výsledný konstrukt  $\Delta spr0595$  homologní k oblastem přilehlých ke genu *spr0595* o velikosti 1974 bp.

#### 5.1.1.5. Transformace *S. pneumoniae* konstruktem $\Delta spr0595k$

Konstrukt  $\Delta spr0595k$ , o velikosti 1974 bp, byl transformován do kmenů Sp346 (Rx  $\Delta spr0595::SweetJanus$ ) a Sp347 (R6  $\Delta spr0595::SweetJanus$ ), u nichž po homologní rekombinaci došlo k vyštěpení a odstranění Sweet Janus kazety. Transformované buňky byly rezistentní k sacharóze (Sp346 - 10% sacharóza; Sp347 - 15% sacharóza) a senzitivní ke kanamycinu. Z vybraných ověřených klonů byly vybrány kmeny pojmenovány **Sp373** (Rx  $\Delta spr0595$ ) a **Sp374** (R6  $\Delta spr0595$ ). Schéma homologní rekombinace těchto konstruktů je zobrazeno na Obr. 9.

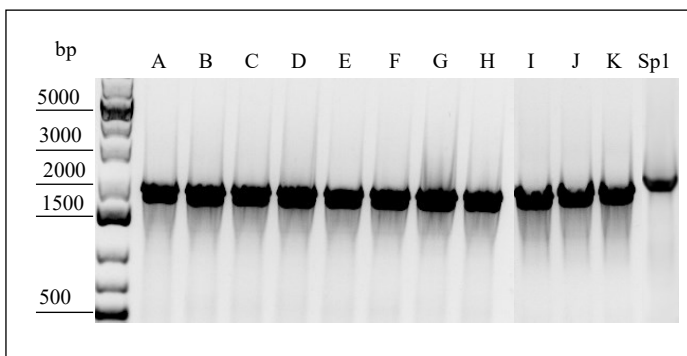


**Obr. 9. Schéma homologní rekombinace konstruktů  $\Delta spr0595k$  s chromozómem *S. pneumoniae* kmenů Sp346 a Sp347.**

- Schéma delečních kmenů v genu *spr0595* s vloženou Sweet Janus kazetou (Sp346 a Sp347); *sacB* – senzitivita k sacharóze; *kan* – rezistence ke kanamycinu; *rpsL<sup>+</sup>* – senzitivita ke streptomycinu.
- Konstrukt  $\Delta spr0595k$  pro odstranění Sweet Janus kazety o velikosti 1974 bp. **R** - oblast homologní rekombinace.
- Schéma nezačleněných delečních kmenů v genu *spr0595* (Sp373 a Sp374). Výsledná chDNA *S. pneumoniae* po rekombinaci konstruktů  $\Delta spr0595k$  a odstranění Sweet Janus kazety. Oligonukleotidy AU154 a AU157 byly použity při ověřování transformantů pomocí koloniové PCR. Vznikl produkt o předpokládané velikosti 1974 bp.

Správnost rekombinace a odstranění Sweet Janus kazety byla ověřena koloniovou PCR (Obr. 10) s použitím oligonukleotidů AU154 a AU157 komplementárních k sekvencím před a za odstraňovanou oblastí (Obr. 9c). Všechny ověřované klony byly pozitivní – vznikl fragment o předpokládané velikosti 1974 bp. Byla provedena kontrolní PCR v kmeni Sp1, kde byl amplifikován produkt o velikosti 2340 bp. Správnost přípravy delečních kmenů Sp373 a Sp374 byla navíc ověřena sekvenací chromozomální DNA.



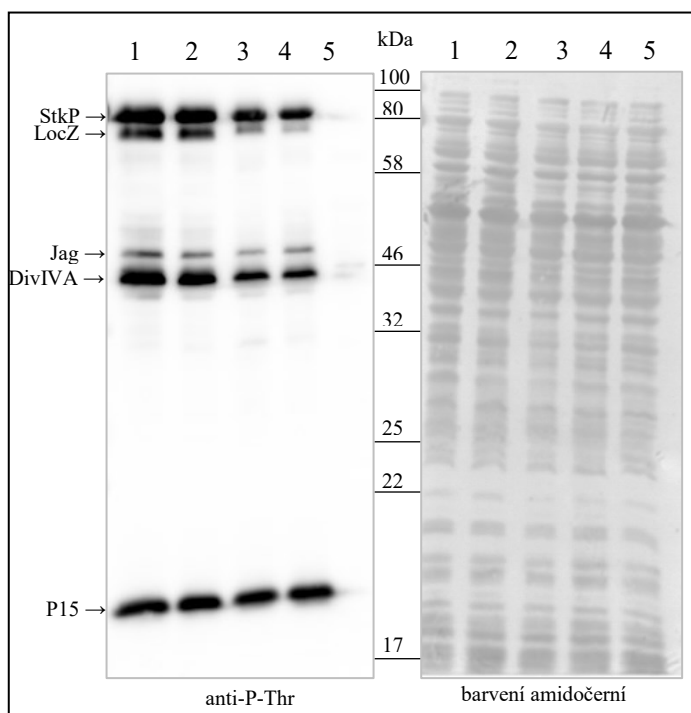


**Obr. 10. Elektroforetogram koloniové PCR.** Dráhy A-H –klony kmene Sp374 (R6;  $\Delta spr0595$ ); dráhy I, J, K - klony kmene Sp373 (Rx;  $\Delta spr0595$ ); kontrola Sp1 – vznikl fragment o předpokládané velikosti 2340bp. U všech ověřovaných klonů vznikly fragmenty o předpokládané velikosti 1974 bp.

#### 5.1.1.6. Ověření fosforylace proteinu Spr0595 kinázou StkP *in vivo*

Za účelem prokázání, zda je protein Spr0595 totožný s fosforylovaným proteinem P15 a tedy substrátem kinázy StkP, bylo provedeno srovnání fosforylačních profilů delečních kmenů  $\Delta spr0595$  s divokým kmenem Sp1.

Z kmenů Sp373 a Sp374 byly získány bakteriální lyzáty pomocí chemické dezintegrace buněk (4.13.3.1), které byly separovány na 1-DE a detekovány imunodetekcí pomocí protilátky proti P-Thr. PVDF membrána byla poté obarvena amidočerní a použita jako kontrola nanášky bílkovin na gel a úspěšnosti přenosu proteinů na membránu. Fosforylační profil detekovaný P-Thr protilátkou byl u mutantních kmenů Sp373 a Sp374 totožný s divokým kmenem Sp1. Fosforylovaný protein P15 byl tedy detekován i u vytvořených delečních kmenů  $\Delta spr595$  (Sp373 a Sp374). Z této analýzy vyplývá, že fosforylovaný protein P15 neodpovídá proteinu Spr0595 a zřejmě rhodanáza není substrátem kinázy StkP. Jako negativní kontrola fosforylace byl použit kmen Sp10 ( $\Delta stkP$ ), u kterého nebyl pomocí P-Thr protilátky detekován žádný fosforylační signál.



**Obr. 11. 1-DE proteinových lyzátů *S. pneumoniae* (12% gel). P-Thr imunodetekce (vlevo), amidočerní obarvená membrána (vpravo). Standard molekulových hmotností v kDa uveden mezi obrázky.**  
 1 – Kmen Sp1 (Rx) – pozitivní kontrola  
 2 – Kmen Sp346 (Rx;  $\Delta spr0595$ )  
 3 – Kmen Sp347 klon A (R6  $\Delta spr0595$ )  
 4 – Kmen Sp347 klon B (R6  $\Delta spr0595$ )  
 5 – Kmen Sp10 (Rx  $\Delta stkP$ ) – negativní kontrola.

## 5.2. Fosforylace proteinu FtsA *in vitro* a *in vivo*

Bylo prokázáno, že protein FtsA *S. pneumoniae* je substrátem kinázy StkP *in vitro* (Beilhartz *et al.*, 2012). Podle našich předběžných výsledků získaných z analýzy globálního fosfoproteomu *S. pneumoniae* založené na  $TiO_2$  obohacení fosopeptidů ve spojení s LC-MS analýzou bylo u proteinu FtsA identifikováno místo fosforylace StkP kinázou na treoninu 404 (T404). Dalším cílem této práce bylo prokázat, že protein FtsA je *in vivo* substrátem kinázy StkP a ověřit, že T404 je skutečné místo fosforylace proteinu FtsA kinázou StkP.

### 5.2.1. Ověření fosforylačního místa proteinu FtsA *in vitro*

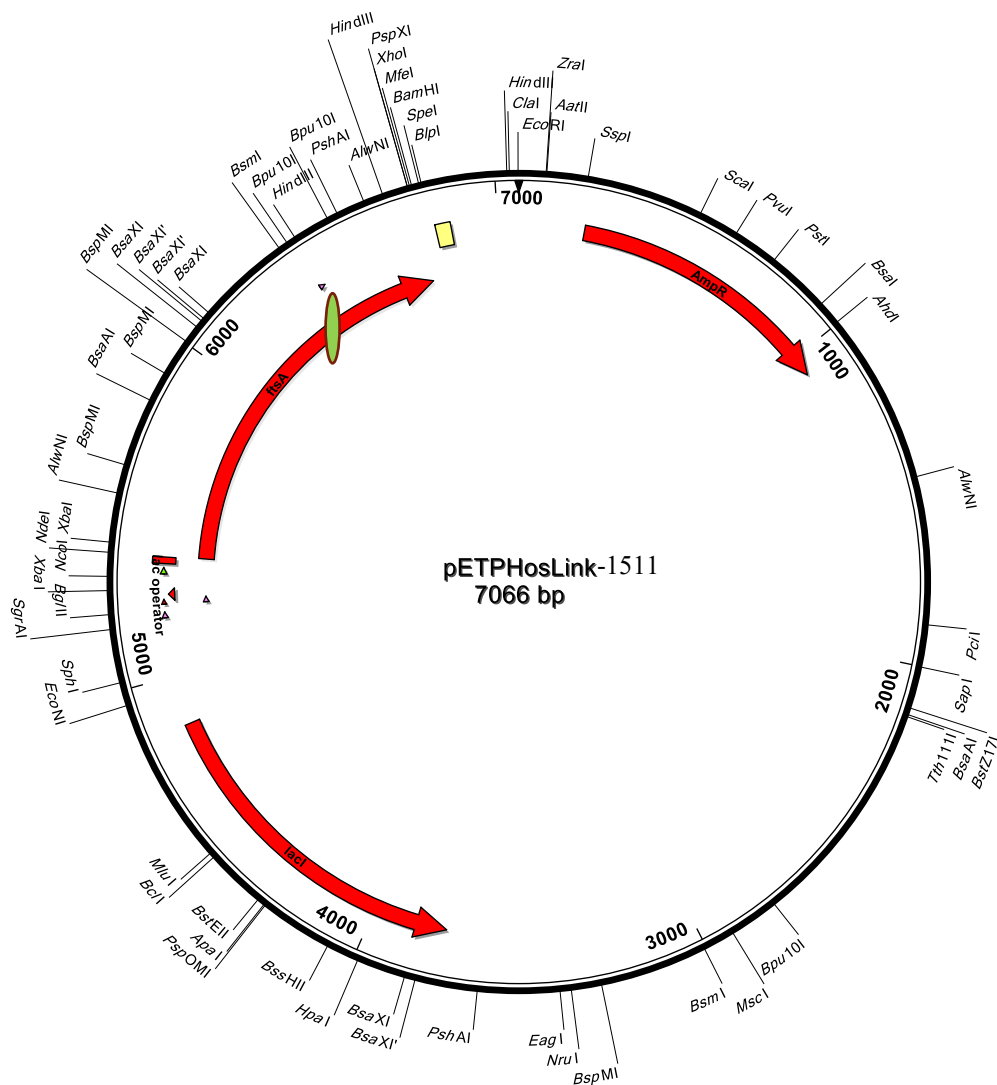
Pro ověření fosforylace T404 u FtsA proteinu proteinkinázou StkP *in vitro* byly z expresních kmenů *E. coli* purifikovány rekombinantní proteiny FtsA, FtsA-T404A a kinázová doména proteinu StkP (StkP-KD), která si zachovává svoji aktivitu a tedy je schopna jak autofosforylace, tak fosforylace jejích substrátů. Kmeny pro expresi FtsA a StkP-KD byly převzaty z laboratorního archivu a expresní kmen pro protein FtsA-T404A byl připraven v rámci této diplomové práce.

#### 5.2.1.1. Příprava vektoru pro expresi FtsA-T404A

Za účelem ověření T404 jako místa fosforylace proteinu FtsA, byl gen *ftsA* mutován tak, aby byla vytvořena aminokyselinová záměna treoninu v dané pozici (404) za nefosforylovatelný alanin (fosfoablativní záměna). K záměně byl použit vektor pETPhosLink-1511 (Obr. 12), do kterého byl vložen gen *ftsA* fúzovaný s histidinovou kotvou, která byla využita pro následnou purifikaci. Tento vektor obsahuje ampicilinovou rezistenci jako selekční znak. Místně specifická mutagenese *ftsA* byla provedena soupravou QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), prostřednictvím PCR pomocí navržených mutagenních oligonukleotidů (AU124 a AU125) s danou bodovou mutací (Obr. 13). Po místně specifické mutagenesi byl mutovaný vektor pojmenován **pETPhosLink-ftsA-T404A**.

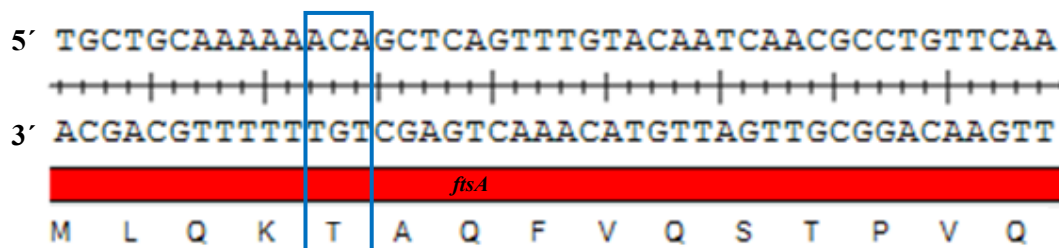
Tento vektor, obsahující bodovou mutaci, byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). Klony s transformovaným vektorem byly selektovány na LB agaru s ampicilem (100  $\mu$ g/ml) a ověřeny koloniovou PCR pomocí oligonukleotidů AM07(R) a BP23(F), které leží v genu *ftsA*. Bylo testováno 5 klonů na přítomnost fragmentu o velikosti 537 bp a všechny byly pozitivní (Obr. 14).

Z pozitivního klonu č. 2 byl izolován plazmid pETPhosLink-ftsA-T404A a sekvenován pomocí oligonukleotidu BP24 nacházejícího se v sekvenci genu *ftsA* a z univerzálního promotorového oligonukleotidu T7. Vektor ověřený sekvenací, nesoucí mutaci *ftsA*-T404A, byl transformován do kompetentních buněk expresního kmene *E. coli* BL21 a znovu ověřen koloniovou PCR (data nejsou uvedena). Výsledný expresní kmen byl pojmenován jako **Ec258** (BL21; *pETPhosLink-ftsA-T404A*).



**Obr. 12. Genetická mapa plazmidu pETPhosLink-1511.** Na mapě plazmidu jsou označena restrikční místa a červeně jsou označeny geny kódované na plazmidu. Zeleně, v sekvenci genu *ftsA*, je označeno místo bodové mutace T404A. AmpR – ampicilinová rezistence; lacI – LacI represor.

a) Část původní sekvence genu *ftsA* (zobrazeny kodóny pro aminokyseliny 155-169):



### b) Použité oligonukleotidy

3' – TCAAAACCACTTACGACGTTT T T **CT**CGAGTCAAACA– 5' oligonukleotid AU125  
 |||||  
 TTAGTTT TGGTGGGATGCTGCAAAAA **AC**AGCTCAGTTTGTAC část sekvence *ftsA* na  
 AACTAAACCACTTACGACGTTTTT **TG**TCGAGTCAACATG plazmidovém templátu  
 |||||  
 5' – AGTTT TGGTGGGATGCTGCAAAAA **GC**AGCTCAGTTTGT–3' oligonukleotid AU124

c) Část výsledné sekvence genu *ftsA-T404A* (zobrazeny kodóny pro aminokyseliny 155-169):

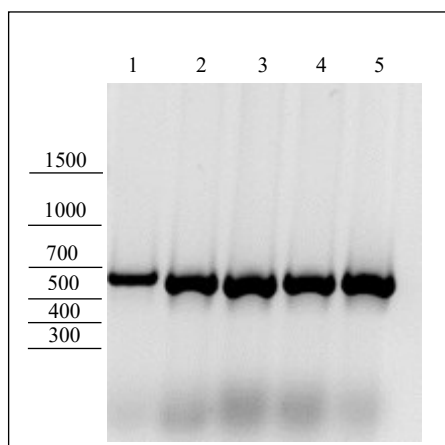
5' TGCTGCAAAAAGCAGCTCAGTTTGTACAATCAACGCCTGTTCAA  
ACGACGTTTTTCGTCTGAGTCAAACATGTTAGTTGCGGACAAGTT  
3'

*ftsA-T404A*

M L Q K A A Q F V Q S T P V Q

**Obr 13. Znázornění postupu cílené mutageneze genu *ftsA* na plazmidu pETPhosLink-1511.**

- Zobrazena část sekvence nativního genu *ftsA*. Triplet nukleotidů, tvořících kodón pro aminokyselinu treonin (T) určených k bodové mutaci, byl označen modrým rámečkem.
- Znázornění použitých oligonukleotidů AU124 a AU125 při bodové mutagenезi a komplementární sekvence nativního genu *ftsA* ležícího na plazmidu pETPhosLink-1511. Modře byla zvýrazněna původní sekvence DNA (kódující aminokyselinu treonin), červeně výsledná sekvence po bodové mutagenезi (kódující aminokyselinu alanin).
- Zobrazena část sekvence mutantní alely genu *ftsA-T404A*. Výsledkem mutagenезe byl vektor pETPhosLink-ftsA-T404A s mutací v genu *ftsA* vedoucí k záměně treoninového zbytku (T) za alanin (A) v pozici 404. Červený rámeček označuje triplet nukleotidů tvořící kodón pro aminokyselinu alanin po bodové záměně.



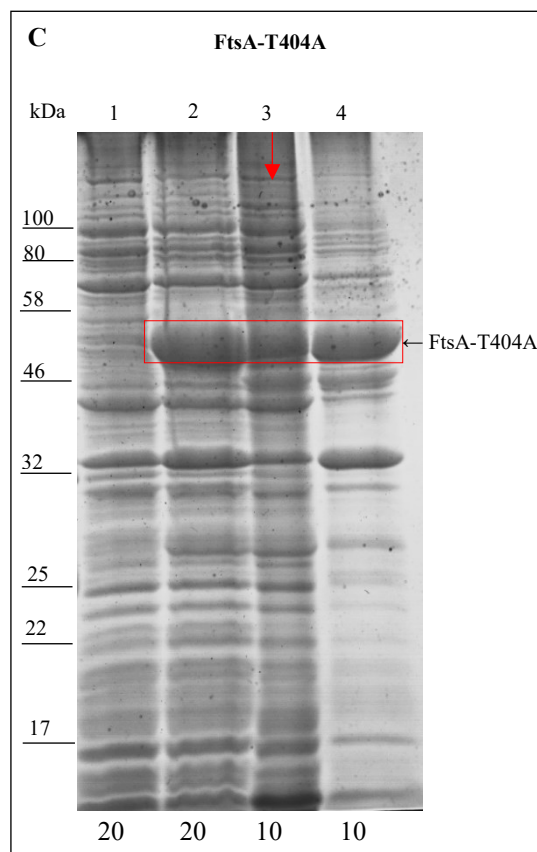
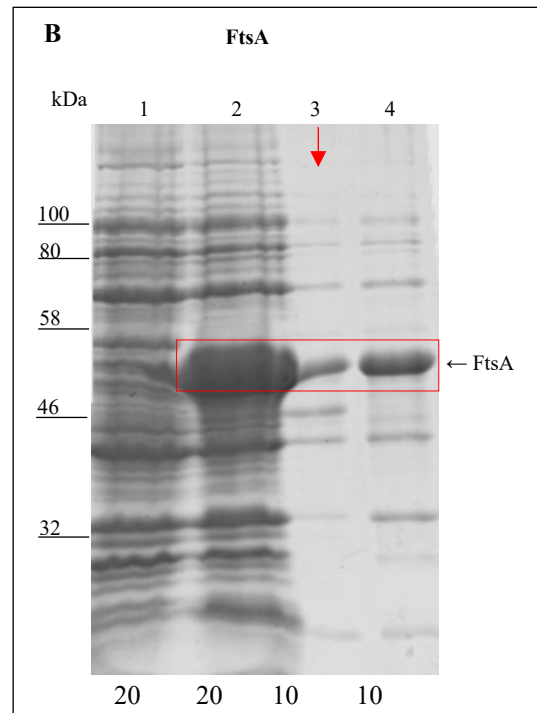
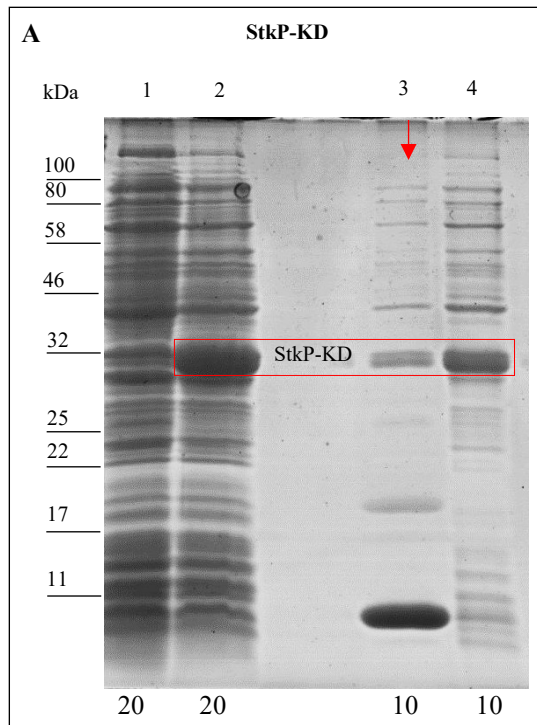
**Obr. 14. Výřez elektroforetogramu kontrolní koloniové PCR pro ověření přítomnosti plazmidu pETPhosLink-ftsA-T404A** – ověření transformace plazmidu pETPhosLink-ftsA-T404A do *E. coli* DH5 $\alpha$ . V drahách 1-5 byly nanесeny PCR produkty vybraných transformovaných klonů 1 až 5 z *E. coli*. Všechny klony obsahují pozitivní fragment o předpokládané velikosti 537 bp. Hodnoty standardu v bp uvedeny v levé části obrázku.

#### 5.2.1.2. Testování exprese bílkovin FtsA, FtsA-T404A a StkP-KD v *E. coli* BL21

Pro ověření místa fosforylace proteinu FtsA (T404) proteinkinázou StkP *in vitro* bylo potřeba purifikovat všechny komponenty této kinázové reakce, tj. proteiny FtsA, FtsA-T404A a StkP-KD. Zároveň byla testována exprese FtsA-T404A v nově vytvořeném kmeni *E. coli* Ec258 a také exprese proteinů FtsA a StkP-KD, které pocházely z laboratorního archivu (kmeny Ec145 a Ec50).

Expresi bílkovin byla indukována 1 mM IPTG po dobu 3 hodin. Detailní informace ke kultivaci bakterií a získání bakteriálního lyzátu jsou popsány v kapitole 4.14.4. Získaný bakteriální lyzát byl pomocí centrifugace separován na nerozpustnou a rozpustnou frakci. Jednotlivé proteinové frakce, odebírané během přípravy vzorku, byly rozděleny pomocí 1-DE a vizualizovány pomocí barvení CCB (Obr. 15A, B, C).

Z Obr. 15 je patrné, že induktor IPTG má vliv na expresi bílkovin FtsA, FtsA-T404A i StkP-KD. Ve všech frakcích odebraných 3 hodiny po indukci je zřetelná zvýšená exprese indukovaných proteinů (označeno červeným rámečkem na Obr. 15 - dráhy č. 2; 3; 4), v porovnání s frakcemi odebranými před indukci (Obr. 15, dráhy č. 1). V drahách č. 3 byl na Obr. 15A detekován v oblasti kolem 32 kDa protein StkP-KD, v oblasti kolem 50 kDa byl na Obr. 15B detekován protein FtsA a na Obr. 15C protein FtsA-T404A. Velké množství indukovaných proteinů bylo zjištěno v nerozpustných bílkovinných frakcích (Obr. 15, dráhy č. 4), které nemohly být použity pro následnou purifikaci příslušného proteinu, neboť bílkoviny zde byly deponovány do inkluzních tělísek a jejich izolace by byla náročná. Pro purifikační účely byly tedy použity pouze rozpustné proteinové frakce (Obr. 15, dráhy č. 3), sice s nižším výtěžkem bílkovin, ale v dostatečném množství pro další použití.



**Obr. 15. Expres a separace rekombinantních proteinů FtsA, FtsA-T404A a StkP-KD s histidinovou kotvou.** Separace proteinových vzorků z *E. coli* pomocí 1-DE (12% gel, barveno CCB), odebíraných během kultivace a následné frakcionace. Sledován vliv induktoru 1 mM IPTG. Hodnoty standardů molekulových hmotností v kDa uvedeny vlevo. V červených rámečcích jsou označeny indukované proteiny. Červenými šipkami označeny frakce použité pro purifikační účely. Množství nanášených frakcí (v  $\mu$ l) uvedeno pod obrázky.

Vzorky: Celkový proteinový profil *E. coli* před indukcí IPTG (1) a po indukcí (2); Získaná rozpustná (3) a nerozpustná frakce (4) po IPTG indukcí.

**Obr. 15A.** Expres proteinu StkP-KD, detekován v oblasti kolem 32 kDa.

**Obr. 15B.** Expres proteinu FtsA, detekován v oblasti kolem 50 kDa.

**Obr. 15C.** Expres proteinu FtsA-T404A, detekován v oblasti kolem 50 kDa.

### 5.2.1.3. Purifikace bílkovin FtsA, FtsA-T404A, StkP-KD

Bílkoviny FtsA, FtsA-T404A a StkP-KD byly izolovány pomocí afinitní chromatografie z rozpustné frakce celkového lyzátu (**HE**) použitím NiNTA nosiče vázající histidinovou kotvu proteinu (QIAGEN). Jednotlivé proteinové frakce získané purifikací na kolonce byly separovány pomocí 1-DE v polyakrylamidovém gelu o koncentraci 12 %. Gel byl obarven pomocí CCB.

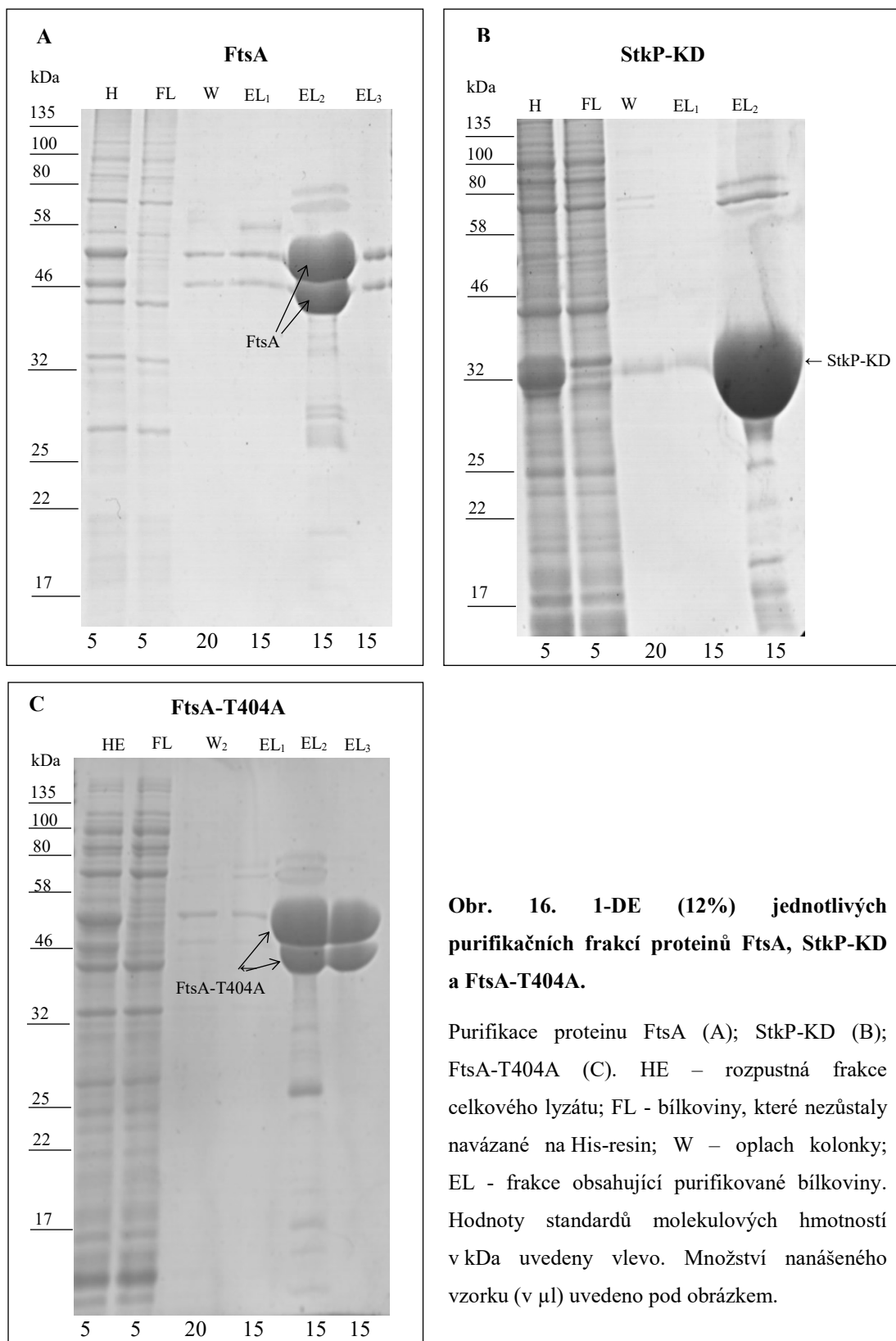
Získaný 1-DE elektroforetogram je zobrazen na Obr. 16. Ve všech případech se podařilo získat purifikovaný protein. Celý proces probíhal dle předpokladů, značná část proteinů protekla kolonkou (fluátová frakce) a v elučních frakcích byl získán exprimovaný protein pro naše účely v dostatečné čistotě, pouze s malým množstvím dalších kontaminujících proteinů.

Protein FtsA a jeho mutovaná forma putovaly v oblasti kolem 50 kDa a byly detekovány ve dvou izoformách. Protein StkP-KD putoval v oblasti kolem 30 kDa jako jeden velký proužek. Pro následné pokusy byly použity druhé eluční frakce získané z kolonek u proteinu FtsA a StkP-KD (Obr. 16A, B) a druhá a třetí eluční frakce u mutovaného proteinu FtsA-T404A (Obr. 16C).

Získané proteiny bylo potřeba pro jejich stabilitu a následné experimenty bez odkladu dialyzovat v pufru Tris-HCl s NaCl (viz. Kap. 4.14.7). Podařilo se nám získat tímto postupem přibližně 1,7 mg FtsA; 4,6 mg FtsA-T404A a 1,5 mg StkP-KD z 200 ml bakteriální kultury.



Všechny purifikované bílkoviny bylo možné použít v kinázové reakci následujícího experimentu.



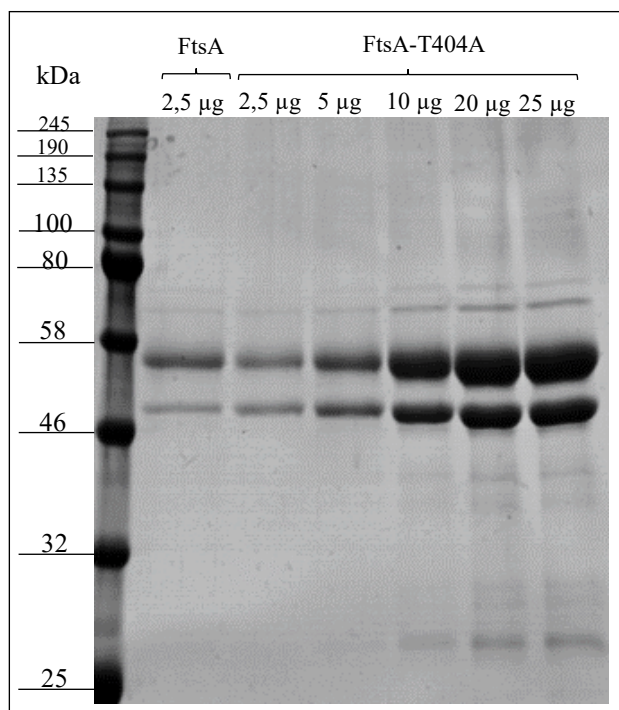
**Obr. 16. 1-DE (12%) jednotlivých purifikačních frakcí proteinů FtsA, StkP-KD a FtsA-T404A.**

Purifikace proteinu FtsA (A); StkP-KD (B); FtsA-T404A (C). HE – rozpustná frakce celkového lyzátu; FL – bílkoviny, které nezůstaly navázané na His-resin; W – oplach kolonky; EL – frakce obsahující purifikované bílkoviny. Hodnoty standardů molekulových hmotností v kDa uvedeny vlevo. Množství nanášeného vzorku (v µl) uvedeno pod obrázkem.

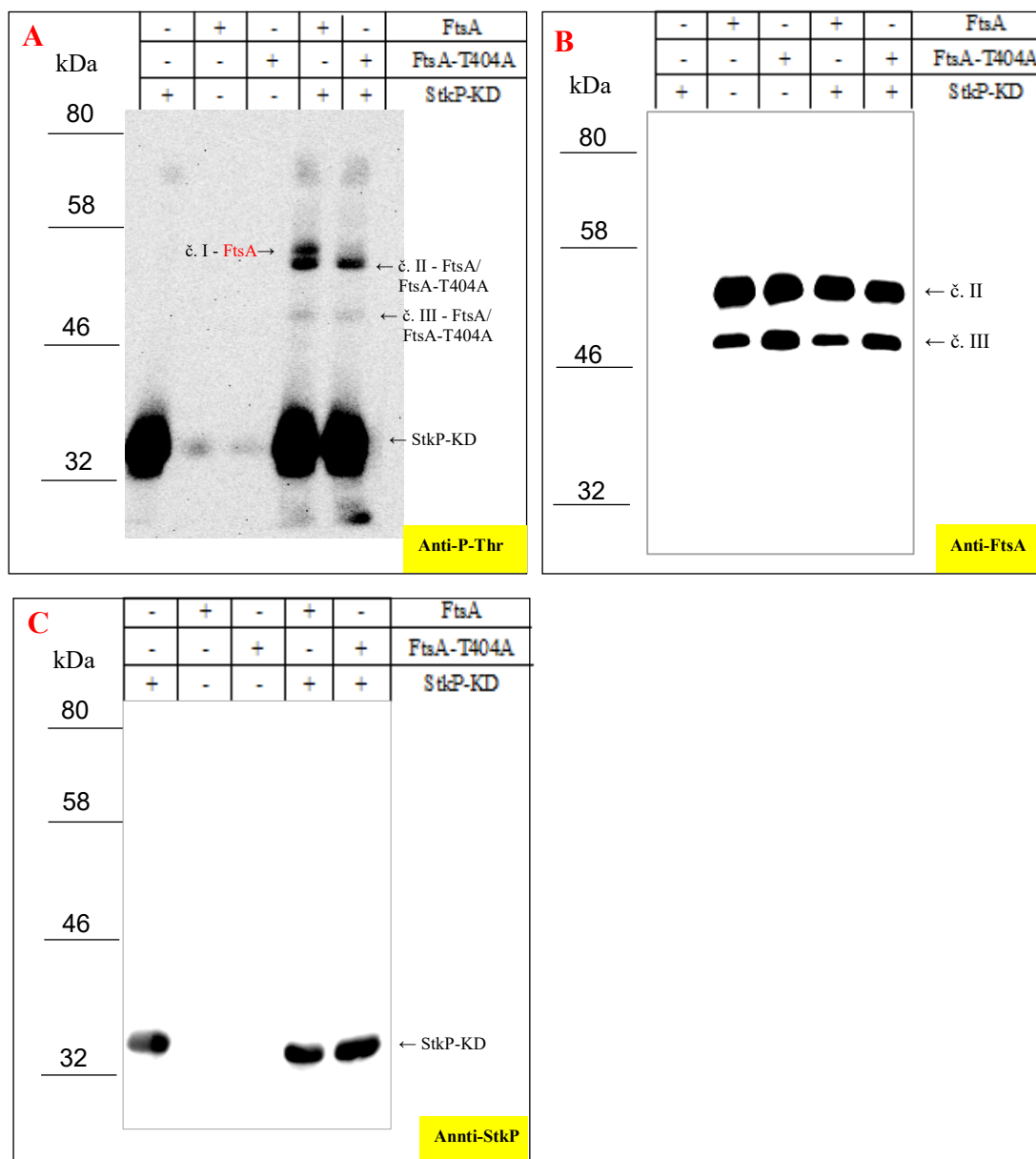
#### 5.2.1.4. *In vitro* kinázová reakce s rekombinantními proteiny

K ověření fosforylačního místa T404 na proteinu FtsA bylo potřeba provést kinázovou reakci *in vitro* v přítomnosti proteinkinázy StkP. V prvním případě byla připravena kinázová reakce obsahující nemutovanou formu FtsA (0,4  $\mu$ g) a kinázovou doménu StkP (StkP-KD; 0,4  $\mu$ g) a v případě druhém, mutovanou formu proteinu FtsA-T404A (0,8  $\mu$ g) a StkP-KD (0,4  $\mu$ g). Přídavek mutované formy FtsA-T404A byl dvojnásobný v porovnání s divokou formou FtsA, protože se dle 1-DE gelu ukázalo, že naměřená koncentrace proteinu FtsA-T404A pomocí BCA stanovení neodpovídá reálným hodnotám vzorku a je přibližně 2x nižší než divoká forma proteinu FtsA (Obr. 17). Kinázová doména proteinu StkP disponuje enzymatickou aktivitou a je postačující pro fosforylaci substrátu v *in vitro* experimentech. Jako kontrolní vzorky posloužily samotné proteiny FtsA (mutovaná a nemutovaná forma) a StkP-KD.

Kinázové reakce probíhaly za standardních podmínek ve 37 °C po dobu 15 minut a byly ukončeny přidáním 5x SB (více viz. Kap. 4.16.2). Vzorky byly rozděleny pomocí 1-DE (9% gel), proteiny byly přeneseny z gelu na PVDF membránu a detekovány pomocí protilátek anti-P-Thr (Obr. 18A), anti-FtsA (Obr. 18B) a anti-StkP (Obr. 18C).



**Obr. 17. Ověření koncentrace proteinů FtsA vs. FtsA-T404A** (12% gel, CBB). Standardy Mr uvedeny vlevo a nanášky bílkovin na dráhu uvedeny nad gelem.



**Obr. 18.** *In vitro* fosforylace proteinů FtsA a FtsA-T404A proteinkinázou StkP-KD (1-DE, 9 %). Imunodetekce bílkovin po kinázové reakci. Proteiny FtsA, FtsA-T404A a StkP-KD; č. I – izoforma proteinu FtsA v oblasti 50 kDa; č. II izoforma proteinu FtsA/FtsA-T404A v oblasti 50 kDa. č. III izoforma proteinu FtsA/FtsA-T404A v oblasti 46 kDa. Vzorky – StkP-KD; FtsA; FtsA-T404A; StkP-KD + FtsA; StkP-KD + FtsA-T404A. Na dráhu gelu nanášeno 20 µl reakce s 5x SB. Velikosti standardů molekulových hmotností uvedeny v kDa v levé části membrán.

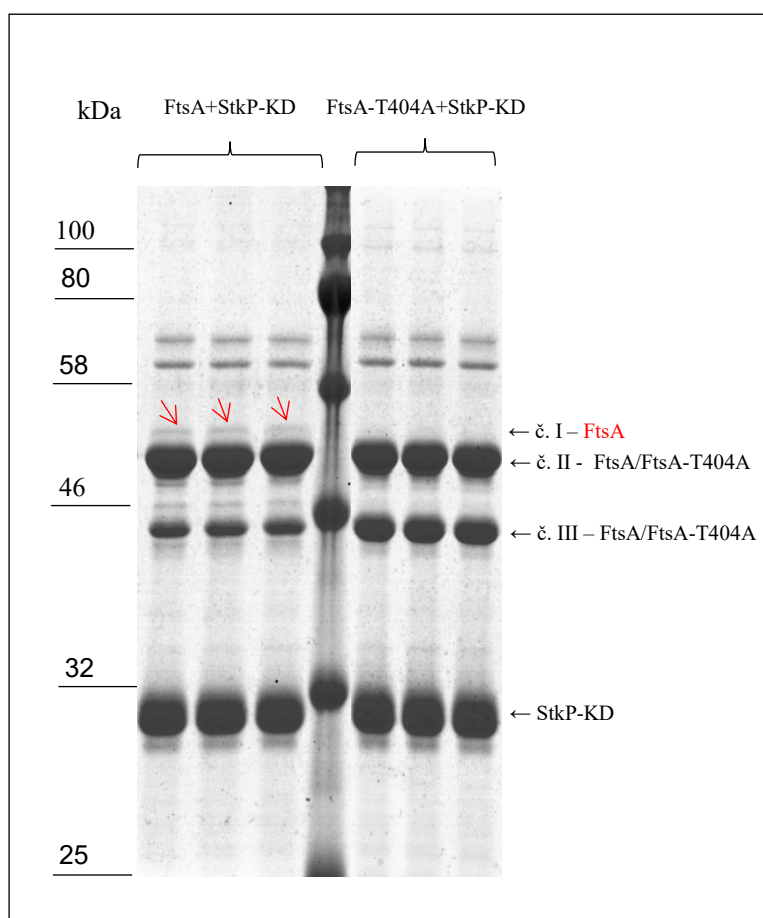
**Obr. 18A.** Anti-P-Thr imunodetekce – detekce fosforylovaných proteinů.

**Obr. 18B.** Anti-FtsA imunodetekce – detekce FtsA/FtsA-T404A.

**Obr. 18C.** Anti-StkP imunodetekce – detekce StkP-KD.

Fosfotreoninová imunodetekce (Obr. 18A) ukázala, že kinázová doména StkP-KD je *in vitro* schopna nejen autofosforylace, ale i fosforylace proteinu FtsA, a to

jak nemutované formy, tak mutované. Navíc je patrný rozdíl mezi fosforylačním signálem těchto dvou forem FtsA. U divoké formy proteinu FtsA byly anti-P-Thr protilátkou detekovány tři izoformy – dvě v oblasti 50 kDa (izoformy č. I a II) a jedna v oblasti 48 kDa (izoforma č. III). Zatímco u mutovaného proteinu FtsA-T404A byly detekovány pouze dvě fosforylované izoformy. Jedna v oblasti 50 kDa (izoforma č. II) a druhá v oblasti 46 kDa (izoforma č. III). Navíc unikátní fosforylovaná izoforma č. I nemutované formy FtsA v oblasti 50 kDa byla detekována také po obarvení bílkovin pomocí CCB ve 12% gelu (označeno červenými šipkami Obr. 19).



**Obr. 19. Separace proteinů po kinázové reakci pomocí 1-DE (12% gel, CCB).** Nanáška: FtsA (7 µg) a FtsA-T404A (14 µg) s StkP-KD (7 µg), jednotlivé vzorky se neliší. Izoforma č. I proteinu FtsA označena červenými šipkami. Izoformy č. II proteinů FtsA a FtsA-T404A; Izoforma č. III proteinů FtsA a FtsA-T404A; StkP-KD. Standard molekulových hmotností (uprostřed gelu) - na levé straně gelu uvedeny jeho velikosti v kDa.

Na rozdíl od P-Thr detekce byly anti-FtsA protilátkou (Obr. 18B) u divoké i mutované formy FtsA detekovány dva proteinové proužky velikostně odpovídající FtsA izoformám č. II a III.

Na Obr. 2C je zobrazena imunodetekce proti StkP, kde je viditelný jasný signál kolem 32 kDa ve všech reakcích obsahujících StkP–KD (dráhy 1; 4; 5).

Tímto pokusem bylo *in vitro* ověřeno, že nemutovaná i mutovaná forma FtsA jsou substrátem proteinkinázy StkP. Také bylo zjištěno, že FtsA má o jednu fosforylovanou izoformu více oproti FtsA-T404A.

#### **5.2.1.5. Separace izoform FtsA a FtsA-T404A pomocí 2-DE po kinázové reakci**

Za účelem lepší separace fosforylovaných izoform proteinu FtsA a FtsA-T404A byla využita metoda 2-DE (12% gel). Proteiny byly nejprve rozděleny podle jejich izoelektrického bodu (1. rozměr) v rozmezí pH 4-7 a následně podle molekulové hmotnosti (2. rozměr).

Byly provedeny kinázové reakce za stejných podmínek jako v Kap. 5.2.1.4, pouze s vyšší koncentrací proteinů. Kinázové reakce obsahovaly: FtsA v reakci s StkP-KD (Obr. 20A) a FtsA-T404A v reakci s StkP-KD (Obr. 20B). Jako negativní kontrola byla připravena kinázová reakce obsahující pouze samotný protein FtsA, kde bez přítomnosti kinázové domény StkP-KD nebude FtsA fosforylován (Obr. 20C).

Obr. 20 shrnuje výsledky separace pomocí 2-DE. Jeden gel byl vždy obarven CCB a druhý paralelní gel posloužil pro imunodetekci pomocí anti-P-Thr protilátky. V oblasti 46-50 kDa na gelu byly detekovány izoformy proteinů FtsA a FtsA-T404A a kolem 32 kDa StkP-KD (byla-li do reakce přidána).

Výsledky ukázaly, že nemutovaná forma FtsA migruje v podobě nejméně 15 izoform, které se liší hodnotou pI, molekulovou hmotností a fosforylací. Z hlediska molekulové hmotnosti můžeme FtsA izoformy rozdělit hned do 3 velikostně odlišných skupin. První dvě skupiny izoform putují v oblasti kolem 50 kDa (Obr. 4A, spoty 1-3 a spoty 4-5; 9-13) a třetí skupina v oblasti kolem 46 kDa (Obr. 4A, spoty 6-8; 14-15). Z anti-P-Thr detekce je zřejmé, že nejméně 9 izoform u divoké formy FtsA je fosforylováno kinázou StkP (Obr. A, spoty 1-8; 14).

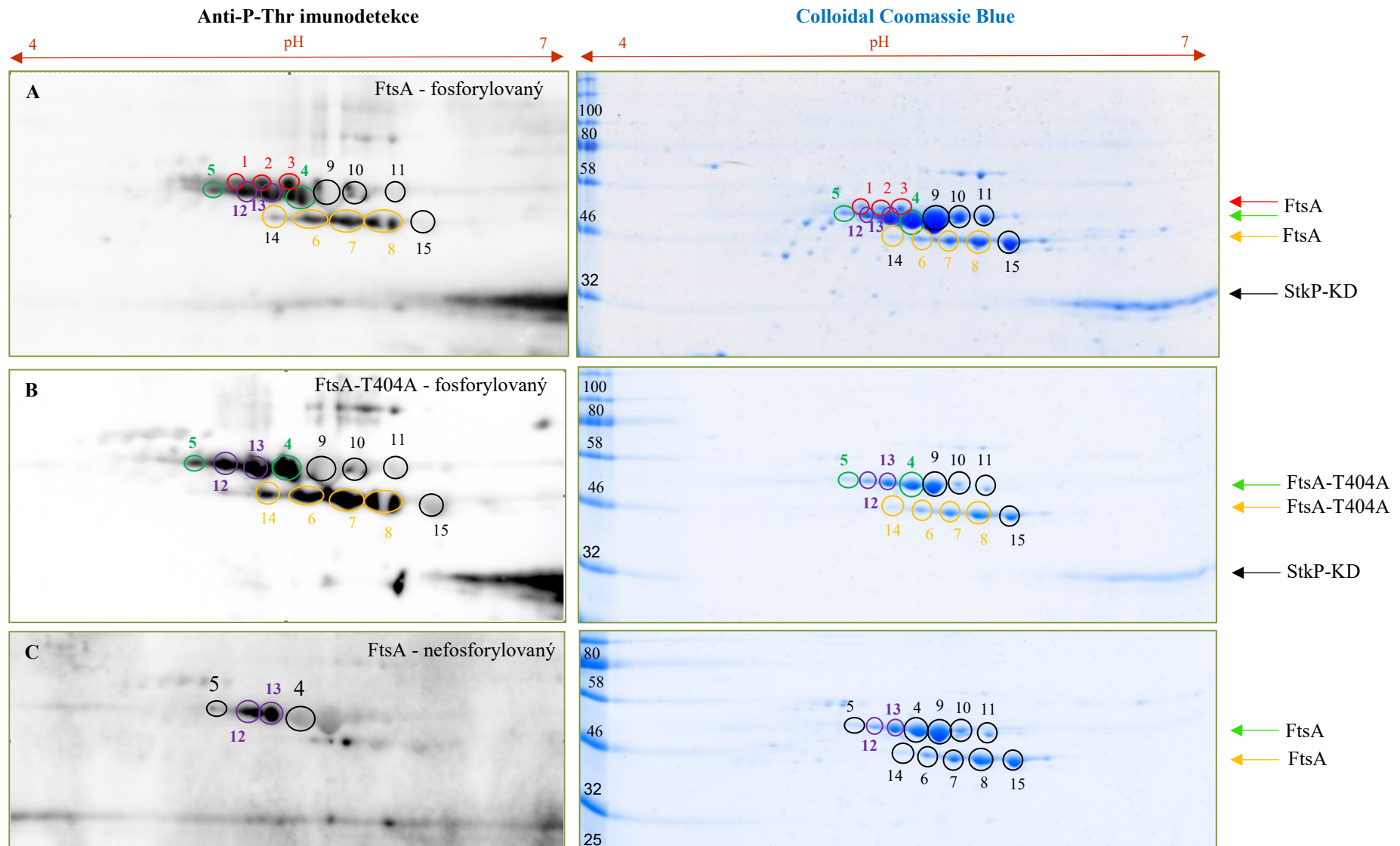
U mutované formy proteinu FtsA-T404A (Obr. 20B) spoty 1-3 s největší molekulovou hmotností nebyly pomocí CCB barvení ani pomocí anti-P-Thr protilátky detekovány. Ostatní fosforylované (spoty 4-5 a 6-8; 14) i nefosforylované izoformy byly detekovány stejně jako u nemutované formy FtsA.

Domníváme se, že fosforylované spoty 1-3 velikostně korepondující s fosforylovaným proužkem č. I, který byl detekován na 1-DE gelu (Obr. 18A; Obr. 19, červená šipka), představují u divoké formy FtsA fosforylovaný aminokyselinový zbytek T404, který u mutované formy FtsA chybí. Aby bylo prokázáno, že se skutečně jedná o T404, který je fosforylován *in vitro* kinázou StkP, byly spoty 1-3 vyříznuty a poslány na MS analýzu kolegům na Univerzitu obrany do Hradce Králové. Proteiny budou v nejbližší době štěpeny trypsinem, fosfopeptidy obohaceny využitím TiO<sub>2</sub> kolonek a analyzovány pomocí LC-MS.

Kromě fosforylovaných spotů 1-3, které jsou detekovány pouze u divoké formy proteinu FtsA po kinázové reakci s StkP-KD, je zde celá řada dalších potenciálních míst fosforylace závislých na kináze StkP (Obr. 20A, B, spoty 4-8), která byla detekována u obou forem FtsA proteinů vystavených působení kinázy (Obr. 20A, B). Ovšem u vzorku FtsA proteinu, který nebyl inkubován s StkP-KD nejsou tato místa detekována (Obr. 20C). Podobně jako spoty 1-3 byly také spoty 4-8 vyříznuty a podrobeny LC-MS analýze. Bohužel, výsledky LC-MS analýzy nebyly v době sepisování této práce vyhotoveny.

Vzorek FtsA, který nebyl inkubován s kinázovou doménou StkP-KD a tudíž by neměl být fosforylován, na snímku Obr. 4C disponuje zbytkovou fosforylací (spoty 12,13).

# Separace proteinů pomocí 2-DE po kinázové reakci FtsA



**Obr. 20. Rozdělení rekombinantních proteinů FtsA a FtsA-T404A po kinázové reakce pomocí 2-DE** (strip pH 4-7 (lineární), 12% gel, detekce: anti-P-Thr imunodetekce a barvení CCB). Standardy molekulových hmotností uvedeny v levé části gelů barvených CCB.

Žlutě jsou označeny fosforylované izoformy proteinu FtsA nebo FtsA-T404A kolem 46 kDa; zeleně fosforylované izoformy proteinu nacházející se u obou variant FtsA (FtsA – WT a FtsA-T404A) v oblasti kolem 50 kDa; červeně fosforylované izoformy proteinu nacházející se pouze u divoké formy FtsA proteinu vystaveného působení StkP-KD; černě jsou označeny nefosforylované izoformy obou variant FtsA; fialově jsou označeny izoformy obou forem FtsA, které nejsou fosforylovány kinázou StkP.

Nanáška proteinů: **Obr. 20A.** FtsA (50 µg) a StkP-KD (50 µg).

**Obr. 20B.** FtsA T404A-T404A (100 µg) a StkP-KD (50 µg).

**Obr. 20C.** FtsA (50 µg).

### 5.2.2. Ověření fosforylace proteinu FtsA *in vivo*

Pro ověření, že fosforylace FtsA proteinu je *in vivo* závislá na proteinkináze StkP, a tedy že FtsA je skutečným substrátem proteinkinázy StkP, byl tento protein purifikován přímo z bakteriální kultury *S. pneumoniae* a jeho fosforylace detekována pomocí anti-P-Thr protilátky. Za tímto účelem byly připraveny merodiploidní kmeny, které obsahovaly gen *ftsA* v nativním lokusu a dále ektopickou kopii nativního nebo mutovaného genu *gfp-ftsA* integrovanou do postradatelného lokusu *bgaA* a exprimovanou z indukibilního zinkového promotoru. Fluorescenční značku GFP, lokalizovanou na N-konci FtsA proteinu, obsahovaly obě formy proteinu FtsA (mutovaný i nemutovaný). Přítomnosti GFP značky bylo využito, kromě mikroskopických lokalizačních studií (viz. níže), pro izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie.

Nejprve byly připraveny vektory, které umožnily vložit jak nativní gen *gfp-ftsA*, tak i mutovaný gen *gfp-ftsA-T404A* do chromozómu *S. pneumoniae* pod kontrolu indukibilního promotoru. Pro tento účel byl vybrán tzv. „shuttle“ vektor pJWV25, jehož vlastností je schopnost replikace v *E. coli* a integrace v *S. pneumoniae* do chromozómu. Díky přítomnosti homologních sekvencí '*gatC*' a '*bgaA*' byla umožněna integrace do neesenciálního *bgaA* lokusu na chromozómu *S. pneumoniae*.

#### 5.2.2.1. Příprava vektoru kódující gen *gfp-ftsA-T404A*

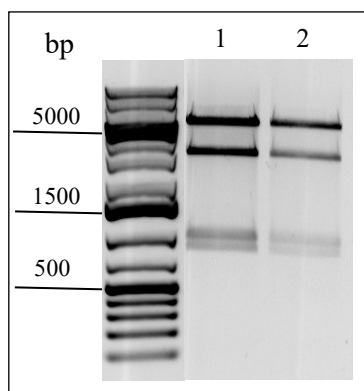
Z kmene *E. coli*, uloženého v laboratorním archivu, byl izolován vektor pJWV25-gfp-ftsA (Ec193). Na tomto vektoru byla exprese proteinu FtsA regulována indukibilním zinkovým promotorem a protein FtsA byl fúzován s GFP, což následně umožnilo purifikaci proteinu. Správnost velikosti izolovaného vektoru byla ověřena štěpením restriční



endonukleázou *NdeI*. Plazmid pJWV25-gfp-ftsA obsahuje 4 restrikční místa pro *NdeI*. Pomocí místně specifické mutagenese (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit - Agilent Technologies), za použití oligonukleotidů AU124 a AU125, byla vytvořena na tomto vektoru mutace, která vedla k fosfoablativní záměně aminokyseliny treoninu (T) za nefosforylovatelnou aminokyselinu alanin (A) v pozici 404 (Obr 13).

#### 5.2.2.2. Transformace vektoru kódující gen *gfp-ftsA-T404A* do *E. coli*

Výsledná PCR směs z Kap.5.2.2.1, obsahující vektory s fosfoablativní záměnou a vektory bez záměny, byla transformována do *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). Transformované buňky byly selektovány na LB agaru s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml). Vybraný pozitivní klon byl pojmenován **Ec265** (pJWV25-gfp-ftsA-T404A) a byly z něj izolovány plazmidy, které byly pro ověření přítomnosti správného plazmidu štěpeny *NdeI* restrikční endonukleázou za vzniku 4 fragmentů (Obr. 21). Přítomnost mutace T404A a správnost sekvence plazmidu byla nakonec ověřena sekvenací vektorů použitím oligonukleotidů BP24 (nacházící se v sekvenci genu *ftsA*), AM08 (ležící v *bgaA* lokusu) a AM05 (nacházící se v sekvenci *gfp* před genem *ftsA*). Vzniklý plazmid byl pojmenován **pJWV25-gfp-ftsA-T404A** (9962 bp).



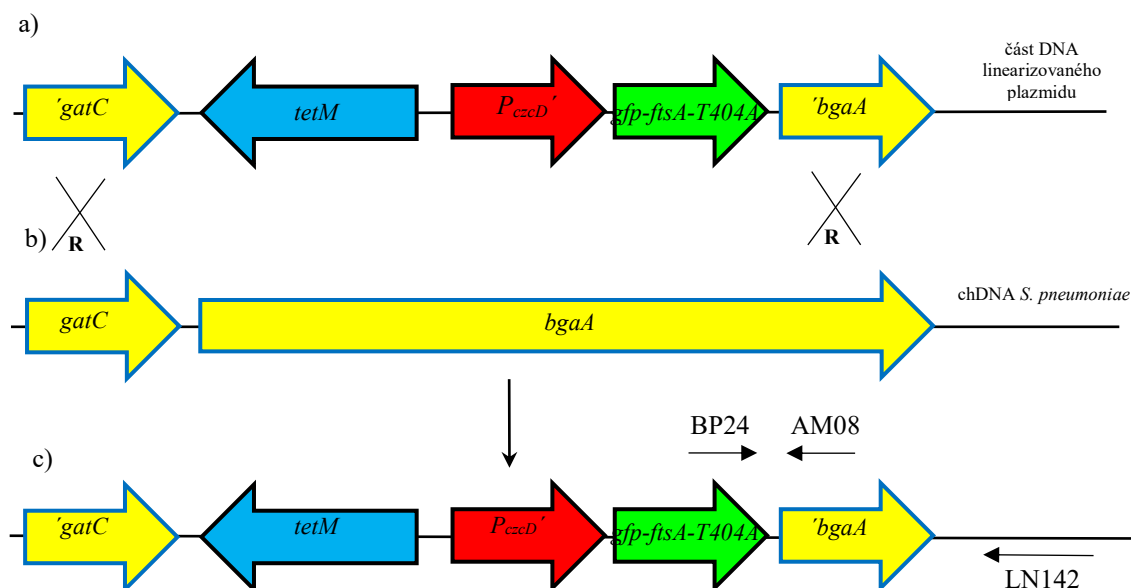
**Obr. 21. Kontrolní elektroforetogram restrikčního štěpení plazmidu pJWV25-gfp-ftsA-T404A.** Standard a jeho velikosti v bp uveden v levé části obrázku.

Očekávané fragmenty po štěpení enzymem *NdeI*: – 4 fragmenty o velikostech 815 bp, 953 bp, 3081 bp, 5113 bp; (1) - klon č. 4; (2) - klon č. 5.

#### 5.2.2.3. Transformace - příprava merodiploidních kmenů *S. pneumoniae*

Vektor pJWV25-gfp-ftsA-T404A a také původní nemutovaný vektor pJWV25-gfp-ftsA byly linearizovány restrikční endonukleázou *PvuI* a poté transformovány do divokých kmenů *S. pneumoniae* s různým genetickým pozadím: Rx (**Sp1** a **Sp155**) a R6 (**Sp208**) a do mutantního Rx kmene s delecí genu *stkP* (**Sp10**), čímž došlo k vložení části vektoru do neesenciálního *bgaA* lokusu na chromozómu *S. pneumoniae* a k vytvoření merodiploidních buněk, ve kterých byl,

kromě nativního genu *ftsA*, obsažen také ektopicky exprimovaný *gfp-ftsA* gen nebo jeho mutovaná forma *gfp-ftsA-T404A*, jejichž exprese byla kontrolována inducibilním zinkovým promotorem  $P_{czcD}$ . Schéma integrace části vektoru pJWV25-*gfp-ftsA-T404A* do chromozómu je zobrazeno na Obr. 22.



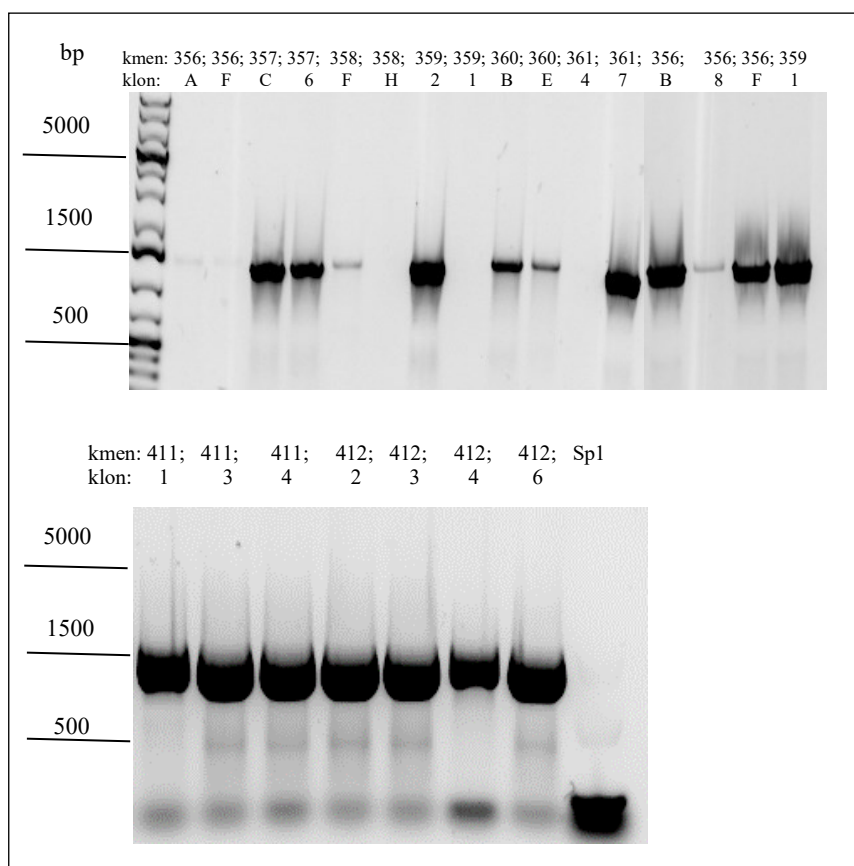
**Obr. 22. Schéma integrace části vektoru pJWV25-*gfp-ftsA-T404A* do *bgaA* lokusu na chromozómu *S. pneumoniae*.**

- Část DNA linearizovaného plazmidu pJWV25-*gfp-ftsA-T404A*. Oblasti 'gatC' a 'bgaA' jsou homologní s geny *gatC* a *bgaA* na chromozómu *S. pneumoniae*, což umožnilo homologní rekombinaci (R), díky které došlo k vložení zobrazené části plazmidu do *bgaA* lokusu na chromozómu *S. pneumoniae*; *tetM* - rezistence k tetracyklinu;  $P_{czcD}$  - zinkový inducibilní promotor.
- Zobrazena oblast chromozomální DNA *S. pneumoniae* s geny *gatC* a *bgaA*, které umožnily homologní rekombinaci (R) s plazmidem pJWV25-*gfp-ftsA-T404A*.
- Výsledná rekombinantní DNA *S. pneumoniae* po integraci části plazmidu pJWV25-*gfp-ftsA-T404A* do *bgaA* lokusu na chromozómu. Oligonukleotidy BP24, nacházející se v původně plazmidové DNA, která je rekombinována do *bgaA* lokusu a LN142 ležící mimo rekombinovanou oblast na chromozómu, byly použity pro ověření rekombinace koloniovou PCR. BP24 s AM08 oligonukleotidy byly použity při ověření přítomnosti mutace T404A sekvenací.

Transformované buňky byly selektovány na miskách s krevním agarem s tetracyklinem. Vybrané pozitivní klony byly ověřeny koloniovou PCR použitím oligonukleotidů LN142 a BP24 (Obr. 23). U pozitivních kmenů byl na elektroforetogramu viditelný proužek, představující amplifikovaný DNA fragment o předpokládané velikosti 1379 bp. Jako negativní kontrola byl použit divoký kmen Sp1, kde nebyl amplifikován žádný fragment. Příprava všech kmenů s mutovanými formami genů *ftsA* byla úspěšná. Do knihovny byly vybrány pozitivní klony z Obr. 23, které jsou shrnuty v Tab. 7.

název kmene	označení klonu	genotyp
Sp356	F	<i>Rx bga::PczcD-gfp-ftsA</i>
Sp357	6	<i>Rx bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A</i>
Sp358	F	<i>Rx AstkP bga::PczcD-gfp-ftsA</i>
Sp359	1	<i>Rx AstkP bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A</i>
Sp360	B	<i>R6 bga::PczcD-gfp-ftsA</i>
Sp361	7	<i>R6 bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A</i>
Sp411	4	<i>Rx bga::PczcD-gfp-ftsA</i>
Sp412	4	<i>Rx bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A</i>

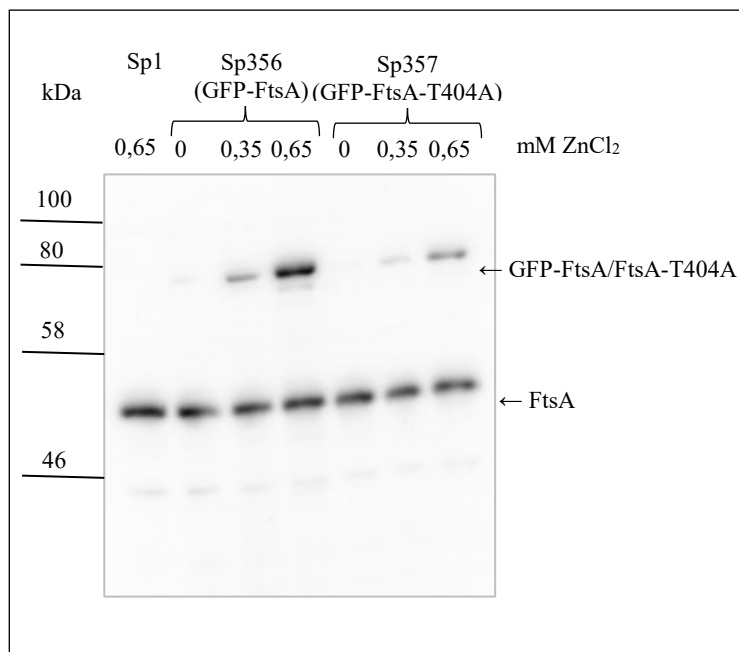
**Tab. 7. Seznam připravených merodiploidních kmenů FtsA a FtsA-T404A u *S. pneumoniae*.** V tabulce je uveden název kmene, označení vybraného klonu a genotyp.



**Obr. 23. Elektroforetogram koloniové PCR – verifikace FtsA a FtsA-T404A merodiploidních kmenů.** Použité oligonukleotidy: LN142, BP24. Velikost amplifikovaných fragmentů u pozitivních klonů 1379 bp. Sp1 použito jako negativní kontrola. Standard a jeho velikosti v bp zobrazeny v levé části obrázků. Některé klony byly testovány dvakrát.

#### 5.2.2.4. Testování exprese proteinů fúzovaných s GFP

Aby bylo dosaženo optimální exprese proteinů GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A za účelem studování jejich lokalizace v buňce, jejich purifikace pomocí GFP-Trap soupravy či za účelem přípravy *ftsA* deplečních kmenů, bylo třeba stanovit optimální hladinu induktoru exprese, tj.  $\text{ZnCl}_2$  v médiu. Proteiny GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A byly purifikovány z bakteriálních lyzátů *S. pneumoniae*, kmeny Sp356 (Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA*) a Sp357 (Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A*). Buňky byly kultivovány v BHI mediu v přítomnosti tří různých koncentrací  $\text{ZnCl}_2$  (0; 0,35; 0,65 mM) a chemicky dezintegrovány (viz. Kap.4.13.3.1). Negativní kontrolou byl divoký Rx kmen (Sp1) pěstovaný při 0,65 mM  $\text{ZnCl}_2$ . Získané bakteriální lyzáty byly rozděleny ve 12% gelu pomocí 1-DE a po přenesení bílkovin na membránu proteiny detekovány anti-FtsA protilátkou (Obr. 24). Signál z imunoblotu byl vyhodnocen na přístroji G:Box Chemi XRQ (SynGene) a množství proteinu tak bylo možné kvantifikovat pomocí programu Gene Tools (SynGene). Výsledek kvantifikace shrnuje Tab. 8.



**Obr. 24. Imunodetekce FtsA z proteinových lyzátů *S. pneumoniae* (1-DE, 12% gel).** Kmen Sp1 byl kultivován v přítomnosti 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub> a kmeny Sp356 a Sp357 v přítomnosti 0; 0,35; 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub>. Molekulová hmotnost v kDa vlevo.

Kmen	Konc. ZnCl <sub>2</sub> (mM)	protein	% exprese
Sp1	0	FtsA	100
Sp356		GFP-FtsA	3
		FtsA	100
	0,35	GFP-FtsA	33
		FtsA	100
	0,65	GFP-FtsA	100
		FtsA	100
Sp357	0	FtsA	100
		GFP-FtsA_T404A	2
	0,35	FtsA	100
		GFP-FtsA_T404A	10
	0,65	FtsA	100
		GFP-FtsA_T404A	40

**Tab. 8. Kvantifikace exprese různých forem FtsA proteinu pod kontrolou indukibilního promotoru.** V tabulce uveden název kmene; použitá koncentrace induktoru exprese ZnCl<sub>2</sub> (mM) v BHI médiu, v jehož přítomnosti byl kmen kultivován; kvantifikovaná forma FtsA proteinu a výsledná hladina exprese proteinu v %, vztažená k nativní formě FtsA bez GFP ve stejném vzorku.

Jako 100% hladina exprese byla stanovena intenzita signálu nativní formy FtsA bez GFP značky, u stejného vzorku pak byla od této hodnoty odvozena hladina proteinu s GFP. Z kvantifikace vyplývá, že exprese GFP-FtsA pod inducibilním promotorem při koncentraci 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub> odpovídá hladině exprese FtsA z nativního lokusu. Při koncentraci 0,35 mM ZnCl<sub>2</sub> byla exprese GFP-FtsA pouze 33 % vzhledem k FtsA exprimovaného ve stejném vzorku z nativního lokusu.

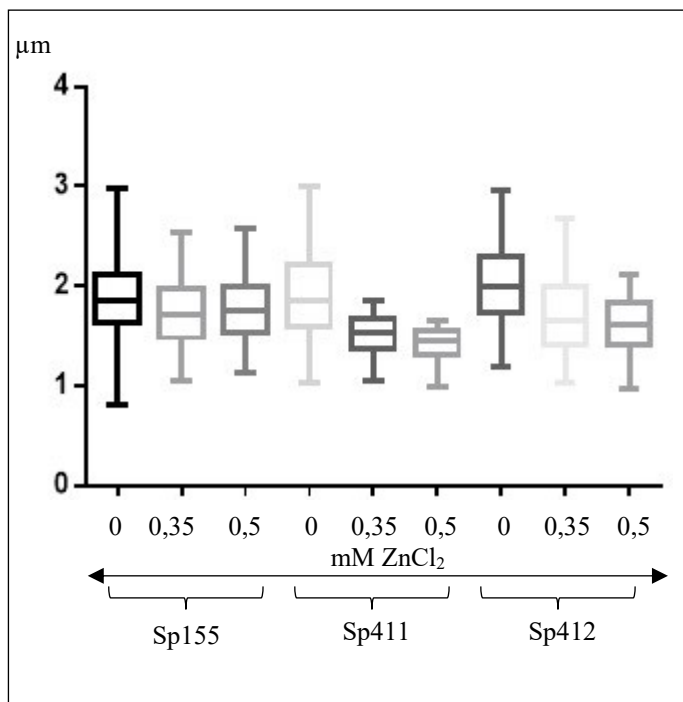
Expresí GFP-FtsA-T404A v přítomnosti 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub> klesla na 40 % divokého FtsA a v přítomnosti 0,35 mM ZnCl<sub>2</sub> dokonce až na 10 % exprese divoké formy FtsA.

#### **5.2.2.5. Morfologie merodiploidních kmenů a lokalizace proteinů fúzovaných s GFP**

Merodiploidní kmeny Sp356, Sp357, Sp360, Sp361, Sp411 a Sp412 mají v *bgaA* lokusu kódován gen *gfp-ftsA*, resp. gen *gfp-ftsA-T404A*, jehož přepisem v přítomnosti Zn<sup>2+</sup> dochází k postupné nadprodukci příslušného proteinu, což by mohlo mít vliv na morfologii buněk a i na lokalizaci proteinu v buňce. Pro určení fenotypu FtsA merodiploidních kmenů exprimujících jak mutovanou, tak divokou kopii genu *ftsA* byl použit fluorescenční mikroskop. Kmeny byly pěstovány v BHI médiu s přidávkou 0; 0,35; 0,5 nebo 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub> do O.D.<sub>600</sub> = 0,36. Preparáty z nich připravené byly pozorovány a dokumentovány fluorescenčním mikroskopem s použitím GFP fluorescenčního filtru. U buněk byla poté měřena jejich délka a sledována exprese a lokalizace FtsA či FtsA-T404A.

##### **5.2.2.5.1 Měření velikosti buněk merodiploidních kmenů v závislosti na expresi mutované či nemutované formy FtsA**

Velikost buněk byla měřena pomocí programu MicroBJ a data analyzována v programu Prism-GraphPad. Hodnoty byly získány měřením asi 400 buněk. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v Tab. 9. a znázorněny v grafu 1. Získané hodnoty velikostí buněk merodiploidních kmenů byly porovnány s parametry divokého kmene Sp155 použitím statistického neparametrického Mann-Whitneyho testu (Prism-GraphPad), z něhož vyplývá, že přestože samotné zinečnaté ionty v médiu mají mírný vliv na velikost buněk divokého kmene Sp155, dochází k výraznějšímu statisticky významnému zmenšování velikostí buněk v závislosti na zvyšující se expresi FtsA nebo FtsA-T404A vlivem přítomnosti induktoru v médiu.



**Graf 1. Analýza délek buněk.** Merodiploidní kmeny (Sp411 a Sp412) a kontrolní divoký kmen Sp155 byly kultivovány v BHI médiu v přítomnosti gradientu  $\text{Zn}^{2+}$  iontů (0-0,5 mM). Délka buněk byla měřena pomocí programu MicrobJ. Graf zpracován v programu Prism-GraphPad z počtu asi 400 buněk.

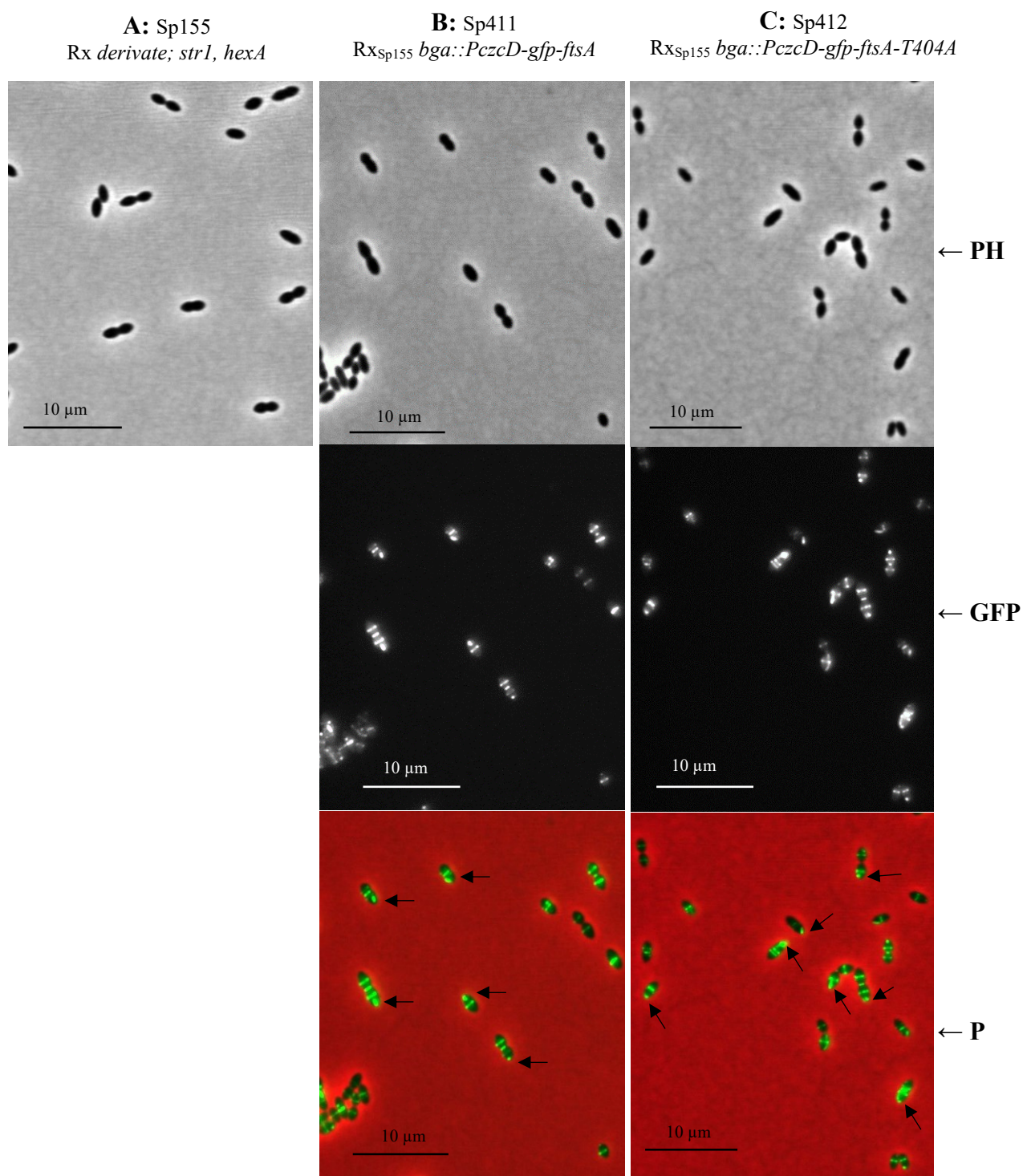
Kmen	mM ZnCl <sub>2</sub>	Medián (μm)	Směrodatná odchylka (μm)
Sp155	0	1,85	± 0,39
	0,35	1,70	± 0,33
	0,5	1,74	± 0,30
Sp411	0	1,86	± 0,23
	0,35	1,54	± 0,19
	0,5	1,45	± 0,15
Sp412	0	2,01	± 0,38
	0,35	1,66	± 0,38
	0,5	1,62	± 0,26

**Tab. 9. Shrnutí naměřených hodnot velikostí buněk.** V tabulce uveden název kmene, použitá koncentrace  $\text{ZnCl}_2$  během kultivace v BHI médiu, medián měřených velikostí buněk v μm a vypočítaná směrodatná odchylka (μm).

#### 5.2.2.5.2 Lokalizace GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A

Vliv fosforylace proteinu FtsA na jeho lokalizaci v buňce byl detekován fluorescenční mikroskopií s použitím fluorescenčního GFP filtru u FtsA merodiploidních kmenů exprimujících WT formu FtsA a mutovanou formu FtsA-T404A. Buňky byly kultivovány do střední exponenciální fáze růstu s přidavkem a bez přidavku induktoru exprese,  $\text{Zn}^{2+}$  iontů a připravené preparáty mikroskopovány. U vzorků bez přidavku  $\text{ZnCl}_2$  nebyla detekována exprese žádného proteinu fúzovaného s GFP. Při použití vyšších koncentrací  $\text{ZnCl}_2$  docházelo k přepisu genů fúzovaných s GFP regulovaných inducibilním zinkovým promotorem. U jednotlivých dělicích se buněk kultivovaných v přítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$  byl detekován normální fenotyp, kde bylo FtsA lokalizováno do ekvatoriálního bodu buňky a do oblasti zavírajícího se septa. Také byl ale zaznamenán u některých buněk změněný fenotyp, kde nejspíše vlivem nadprodukce FtsA nebo FtsA-T404A docházelo k výrazné agregaci těchto proteinů, což se projevilo výraznými shluky GFP signálů v oblasti pólů buněk (Obr. 25 označeno šipkami). Data jsou zobrazena pouze pro kmeny Sp411 a Sp412 pěstovaných při koncentraci 0,5 mM  $\text{ZnCl}_2$  v BHI médiu.





**Obr. 25. Lokalizace GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A.** Kmeny byly kultivovány v BHI médiu s přidavkem 0,5 mM  $\text{ZnCl}_2$ , při teplotě 37 °C do středně exponenciální fáze. Zelený fluorescenční signál představuje lokalizaci GFP-FtsA/GFP-FtsA-T404A. **A** – Sp155 (Rx *derivate*; *str1*, *hexA*); **B** - Sp411 (RX<sub>Sp155</sub> *bga::PczcD-gfp-ftsA*), **C** - Sp412 (RX<sub>Sp155</sub> *bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A*). Agregované GFP signály označeny šipkami. Zkratky uvedené na snímku: PH – fázový kontrast, GFP – GFP filtr, P - překryv fázového kontrastu a GFP filtru.

#### 5.2.2.6. Purifikace proteinů FtsA a FtsA-T404A z *S. pneumoniae*

Z bakteriálního lyzátu *S. pneumoniae* (kmeny Sp356, Sp357 a Sp358) kultivovaných v přítomnosti 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub> byly afinitní chromatografií pomocí soupravy GFP-Trap®\_MA, který obsahuje anti-GFP protilátku navázanou na magnetické agarózové kuličky, purifikovány proteiny GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A (podrobnosti viz. Kap. 4.13.3.5).

Získané proteinové frakce byly separovány pomocí 1-DE (12% a 7% gel) a obarveny pomocí CCB (Obr. 26). Zároveň byly vzorky z paralelní gelové separace přeneseny na PVDF membránu a proteiny detekovány pomocí protilátek proti FtsA a P-Thr (Obr. 27).

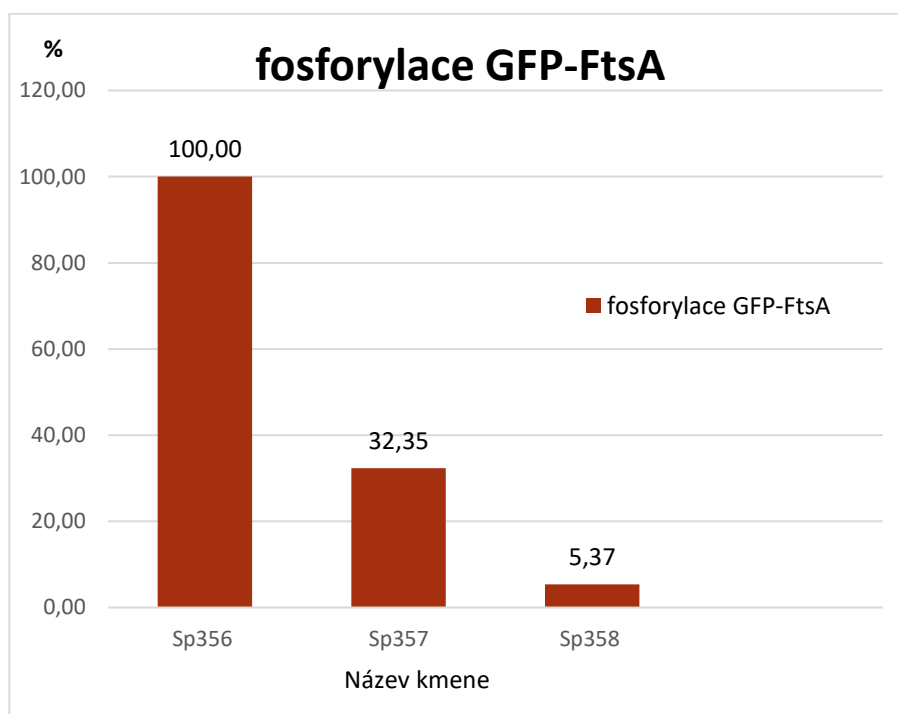
Na Obr. 26 jsou rozděleny jednotlivé bílkovinné frakce z purifikace proteinů GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A. Frakce HE a FL jsou srovnatelné, v oplachových frakcích nebyly detekovány žádné proteiny a v elučních frakcích jsou viditelné kolem 80 kDa purifikované proteiny GFP-FtsA a GFP-FtsA-T40A. Expres proteinu GFP-FtsA-T40A je ovšem nižší v porovnání s divokou formou GFP-FtsA, což koresponduje s pozorováním demonstrovaným na Obr. 24 či Tab. 8. Byly detekovány proteiny i v oblasti kolem 50 kDa, které velikostí odpovídají samotné formě FtsA a FtsA-T404A bez fúzovaného GFP, což bylo pravděpodobně způsobeno schopností polymerace FtsA.

Pomocí detekce anti-FtsA protilátkou bylo potvrzeno, že obohacení GFP-FtsA z bakteriálních lyzátů *S. pneumoniae* proběhlo v pořádku a podařilo se nám získat proteiny GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A, v oblasti kolem 80 kDa (Obr. 27B). Obr. 27B opět dokumentuje sníženou expresi proteinu GFP-FtsA-T404A oproti GFP-FtsA. Na Anti-FtsA imunoblotech byla také prokázána přítomnost i nativní formy FtsA/FtsA-T404A v oblasti 50 kDa, který byl zastoupen v menším množství než GFP-FtsA/GFP-FtsA-T404A. Obě formy FtsA byly detekovány v celém procesu purifikace, ve všech frakcích kromě oplachových.

Imunodetekce anti-P-Thr protilátkou ukázala (Obr. 27A), že GFP-FtsA v kmeni Sp358 není fosforylován, což je způsobeno delecí kinázy v tomto kmeni (negativní kontrola pokusu). Nejsilnější intenzita fosforylace byla zaznamenána v kmeni Sp356 s nemutovanou formou proteinu FtsA a slabší pak v kmeni Sp357 s mutovanou formou FtsA-T404A, což ovšem koresponduje s detekovanou sníženou expresí FtsA-T404A (Obr. 26, Obr. 27B, Tab. 8)

Aby bylo prokázáno, že u modifikovaného proteinu GFP-FtsA-T404A došlo k výraznému snížení fosforylace kinázou StkP, bez ohledu na sníženou expresi samotného proteinu GFP-FtsA-T404A, byla provedena kvantifikace fosforylačního signálu (Graf 2) ze získané P-Thr imunodetekce pomocí softwaru Quantity One (BioRad). Intenzita

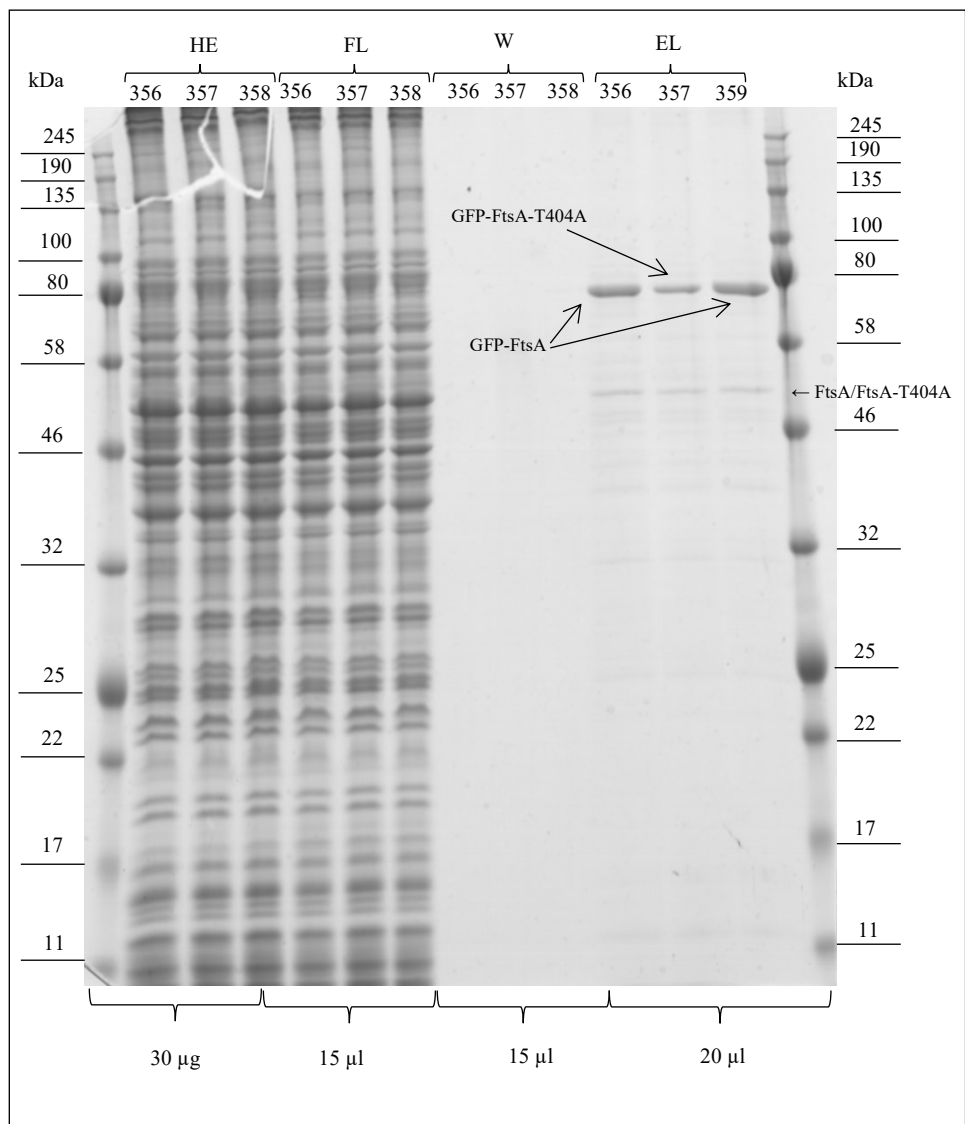
fosforylačního signálu byla normalizována vzhledem k celkovému množství purifikovaného proteinu detekovaného CCB v gelu (Obr. 26) nebo na amidočerní barvené membráně. U mutantního proteinu FtsA-T404A došlo k výraznému snížení na 32 % v porovnání s divokou alelou (100 %). Fosforylační signál detekovaný u divoké formy proteinu GFP-FtsA exprimovaného na pozadí mutantního kmene  $\Delta$ StkP (Sp358) byl zanedbatelný 5 %. Lze tedy předpokládat, že aminokyselinový zbytek T404 proteinu FtsA je skutečným místem fosforylace kinázou stkP.



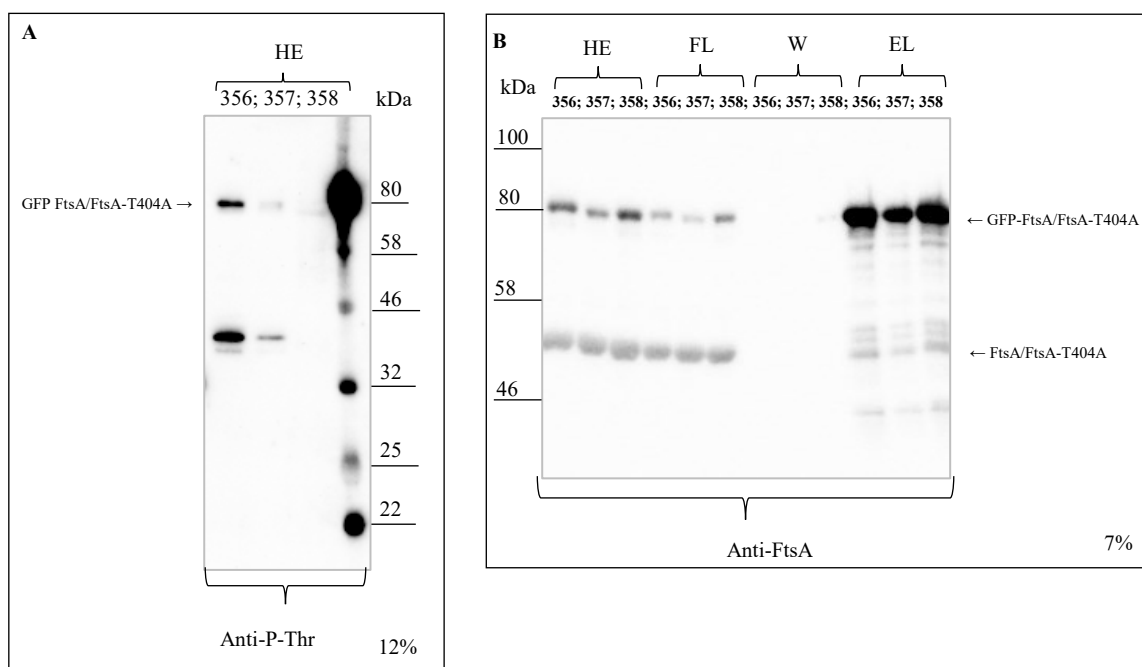
**Graf 2. Kvantifikace fosforylace GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A.** Sp356 (Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA*); Sp357 (Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A*) GFP-FtsA-T404A; Sp358 (Rx *ΔstkP bga::PczcD-gfp-ftsA*).

V oblasti mezi 32 kDa a 46 kDa byl anti-P-Thr protilátkou detekován fosforylační signál jiného proteinu, kopurifikovaného spolu s GFP-FtsA/FtsA-T404A. Určení jeho identity není ovšem předmětem této diplomové práce.

Tímto pokusem bylo v podmínkách *in vivo* prokázáno, že protein FtsA je skutečným substrátem kinázy StkP.



**Obr. 26. Purifikace FtsA a FtsA-T404A pomocí GFP-trap soupravy na 1-DE (12% gel, CCB barvení).** Standard molekulových hmotností v kDa vyobrazen na levém i pravém okraji gelu. Na dráhy nanášeny proteinové frakce kmenů *S. pneumoniae* (Sp356, Sp357, Sp358) - HE – hrubý extrakt (celková proteinová frakce), FL - bílkoviny, které nezůstaly navázány na imobilizované anti-GFP protilátce, W – oplach kuliček, EL – eluční frakce obsahující purifikované proteiny (označeny šipkami). Pod gelem uvedeno množství nanášky.



**Obr. 27. Imunodetekce bílkovin z jednotlivých purifikačních kroků izolace proteinů GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A použitím GFP-trap soupravy.** (1-DE, 12% a 7% gel). Frakce získány z lyzátu *S. pneumoniae* kmenů Sp356, Sp357, Sp358 – hrubý extrakt (HE), fluát (FL), oplachová (W) a eluční frakce (EL). Velikosti standardu v kDa v levé nebo pravé části obrázků.

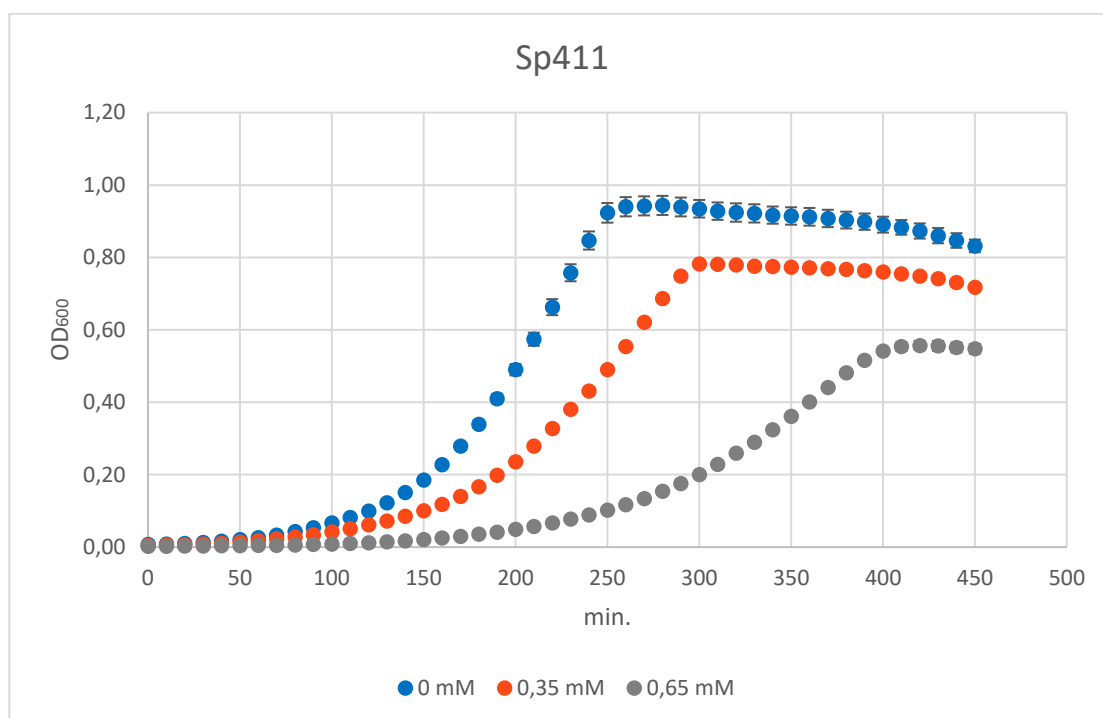
**Obr. 27A.** Anti-P-Thr imunodetekce; 12% gel

**Obr. 27B.** Anti-FtsA imunodetekce; 7% gel

### 5.2.3. Delece nativního genu *ftsA*

Dalším cílem této diplomové práce bylo ověření, zda je kmen *S. pneumoniae* kódující pouze mutovanou alelu genu *ftsA-T404A* životaschopný. Jelikož je gen *ftsA* esenciální (Mura *et al.*, 2016), byl nejprve připraven merodiploidní kmen (viz. 5.2.2.3), který nesl gen *ftsA* v nativním lokusu a ektopickou kopii nativního genu *gfp-ftsA* nebo mutovaného genu *gfp-ftsA-T404A* regulovaného inducibilním zinkovým promotorem a následně mohl být, v přítomnosti zinku, odstraněn nativní gen *ftsA* z chromozómu *S. pneumoniae* pomocí konstruktů *ftsA::P<sub>lesscat</sub>* (Mura, *et al.*, 2016) nesoucí chloramfenikolovou rezistenci. Životaschopnost takto připraveného deplečního kmene *ftsA::P<sub>lesscat</sub>* *bga::P<sub>czcD</sub>-gfp-ftsA-T404A* by tedy měla být závislá na přítomnosti  $Zn^{2+}$  iontů v médiu. Jelikož je *ftsA* esenciální gen, růst získaných takto připravených deplečních kmenů je závislý na expresi ektopické kopie *ftsA* genu regulovaného inducibilním zinkovým promotorem. Tzn., že *ftsA* depleční kmeny budou růst pouze v přítomnosti  $Zn^{2+}$  v médiu. Před samotnou transformací byl testován růst všech merodiploidních kmenů (Sp356, Sp357, Sp360, Sp361,

Sp411 a Sp412), s různým genetickým pozadím, pomocí spektrofotometru Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific). Z Obr. 28 je patrné, že vyšší koncentrace  $\text{ZnCl}_2$  (0,65 mM) inhibuje růst velmi drasticky. Výsledek růstové křivky byl pro všechny testované merodiploidní kmeny stejný (data uvedena pouze pro kmen Sp411). Vzhledem k těmto výsledkům byla pro další experimenty preferována koncentrace 0,35 mM  $\text{ZnCl}_2$  v médiu, přestože exprese ektopické kopie FtsA byla nejvyšší při koncentraci 0,65 mM  $\text{ZnCl}_2$  (Obr. 24, Tab. 8).

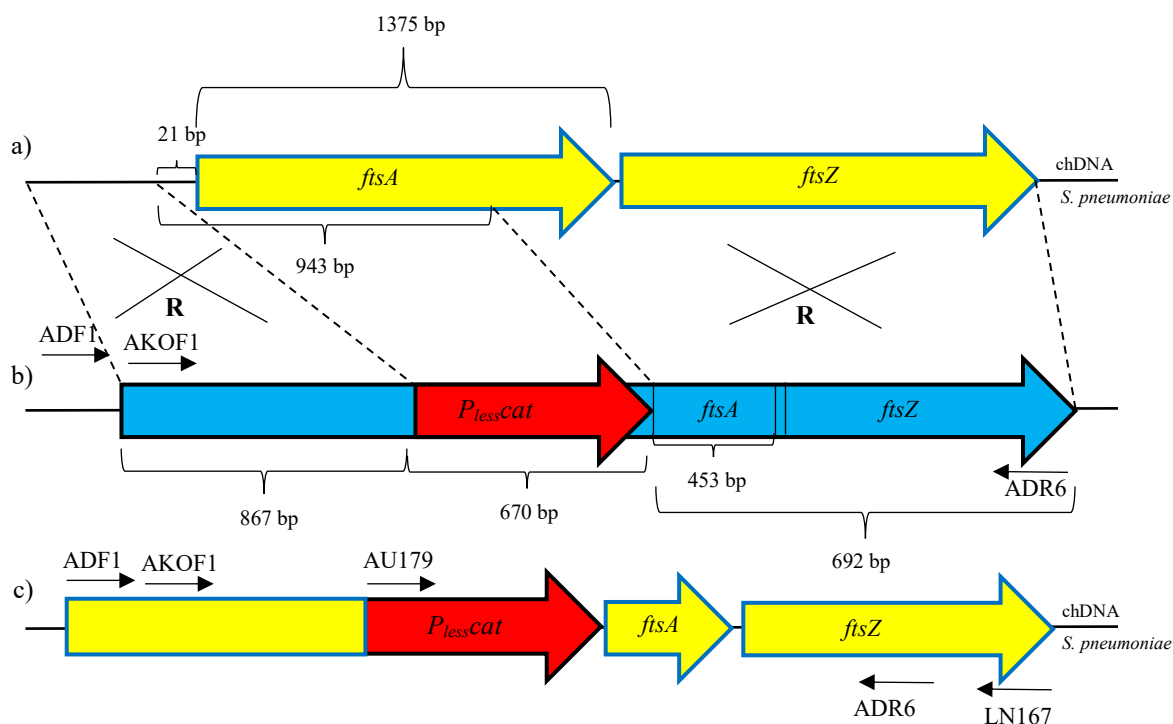


**Obr. 28.** Růstová křivka merodiploidního kmene Sp411 ( $\text{Rx}_{\text{Sp155}} \text{ bga}::\text{PczcD-gfp-ftsA}$ ). Kmen kultivován v BHI médiu při 37 °C ve třech koncentracích  $\text{ZnCl}_2$  (0 mM – modrá; 0,35 mM – oranžová; 0,65 mM – šedá). V grafu jsou vynášeny průměry z více měření se směrodatnými odchylkami.

### 5.2.3.1. Transformace konstruktů *ftsA::P<sub>lesscat</sub>* do FtsA merodiploidních kmenů *S. pneumoniae*

Konstrukt pro delecí genu *ftsA* v nativním lokusu, *ftsA::P<sub>lesscat</sub>*, byl amplifikován pomocí oligonukleotidů AKOF1 a ADR6. Jako templát byla využita chDNA kmene AM417 s již odstraněným *ftsA* z nativního lokusu z laboratorního archivu. Amplifikovaný deleční konstrukt, o velikosti 2229 bp, obsahoval oblast před genem *ftsA*, kazetu *P<sub>lesscat</sub>*, nesoucí chloramfenikolovou rezistenci (Mura et al., 2016) a C-terminální část genu *ftsA* s částí genu *ftsZ* (Obr. 29b). Tento konstrukt byl transformován do merodiploidních kmenů *S. pneumoniae* Sp356 ( $\text{Rx } \text{bga}::\text{PczcD-ftsA-gfp}$ ); Sp357 ( $\text{Rx } \text{bga}::\text{PczcD-ftsA-gfp } T404A$ ); Sp360

(R6 *bga::PczcD-ftsA-gfp*); Sp361 (R6 *bga::PczcD-ftsA-gfp T404A*); Sp411 (Rx<sub>Sp155</sub> *bga::PczcD-gfp-ftsA*) a Sp412 (Rx<sub>Sp155</sub> *bga::PczcD-gfp-ftsA\_T404A*). Merodiploidní Rx kmeny Sp356, Sp411 a Sp357, Sp412 mají shodný genotyp. Byly připraveny ze stejného Rx divokého kmene, který ale pochází z různých zdrojů. Schéma transformace je zobrazeno na Obr. 29.

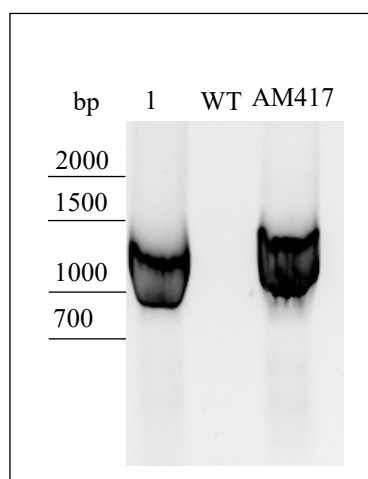


**Obr. 29. Schéma rekombinace *ftsA::Plesscat*. a delece *ftsA* v nativním lokusu *S. pneumoniae*.**

- Zobrazena oblast chDNA *S. pneumoniae* s geny *ftsA* a *ftsZ*.
- Zobrazen konstrukt *ftsA::Plesscat* použitý pro deleci *ftsA* obsahující geny: *Plesscat* kódující chloramfenikolovou rezistenci a části genů *ftsA* a *ftsZ*. AKOF1 a ADR6 jsou oligonukleotidy použité pro amplifikaci konstrukt *ftsA::Plesscat*. Oligonukleotidy ADF1 a ADR6 byly použity pro amplifikaci fragmentu určeného k sekvenování výsledných kmenů.
- Výsledná chDNA po rekombinaci *ftsA::Plesscat*, kdy došlo k odstranění části *ftsA* genu. AU179 a LN167 oligonukleotidy použité pro ověřovací koloniovou PCR.

Transformace probíhala v kompetenčním BHI médiu. Transformované buňky byly selektovány v gelóze nebo na KA s chloramfenikolem o koncentraci 0,45 µg/ml. Závislost získaných deplečních kmenů na přítomnost  $Zn^{2+}$  v médiu byla testována na KA s přidavkem 0,35 mM  $ZnCl_2$  a bez něj. Pozitivní klony by neměly růst bez přítomnosti  $Zn^{2+}$ , protože *ftsA* z nativního lokusu by mělo být odstraněné a geny *gfp-ftsA* či *gfp-ftsA-T404A* regulované inducibilním zinkovým promotorem by neměly být v nepřítomnosti  $Zn^{2+}$  exprimovány. Překvapivě ovšem byly transformací do merodiploidních kmenů připravených na pozadí R6

divokého kmene získání pouze transformanti rezistentní k chloramfenikolu, ale všechny klony byly schopné růstu bez přítomnosti  $Zn^{2+}$ . Uspokojivější situace byla zaznamenána u kmenů na genetickém pozadí *Rx* divokého kmene, kde přibližně 12% klonů (*Rx ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA*; *Rx ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA*) bylo pozitivních, které na miskách bez přídavku  $Zn^{2+}$  iontů (0,35 a 0,65 mM) nenarostly. Kontrolní koloniová PCR (Obr. 30) vybraného pozitivního klonu (*Rx bga::PczcD-gfp-ftsA*) použitím oligonukleotidů AU179 a ADR6, které jsou součástí transformovaného konstrukt, potvrdila přítomnost tohoto fragmentu u CmR získaných transformantů. Vznikl fragment o předpokládané velikosti 1362 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit kmen AM417 a jako negativní divoký kmen Sp1, u kterého nebyl amplifikován žádný fragment. Vzhledem k lokalizaci navržených oligonukleotidů použitých v koloniové PCR nebylo možné prokázat, zda-li byl deleční konstrukt *ftsA::P<sub>less</sub>cat* správně integrován do nativního *ftsA* lokusu, proto byla z pozitivního delečního klonu izolována chDNA a z ní amplifikován fragment pomocí oligonukleotidů ADF1 a ADR6, který byl sekvenován. Sekvence potvrdila správnost přípravy *ftsA* delečního kmene Sp404 (*Rx ΔftsA bga::PczcD-gfp-ftsA*). Nicméně po přeočkování klonu Sp404 do tekutého BHI média nebyly kultury schopné růstu v přítomnosti  $Zn^{2+}$  ani bez něj. Podobné chování jsme zaznamenali také u klonů Sp405 (*Rx ΔftsA bga::PczcD-gfp-ftsAT404A*).



**Obr. 30.** Výřez elektroforetogramu kontrolní koloniové PCR kmene; *Rx ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA* (1), kde byl amplifikován fragment o předpokládané velikosti 1362 bp. Kmen AM417 (*Rx<sub>Sp155</sub> ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA*) použit jako pozitivní kontrola a divoký kmen (WT) jako negativní. Použité oligonukleotidy AU179 a ADR6. Standard a jeho velikosti v bp uvedeny v levé části obrázku.

Snaha o delecí *ftsA* v nativním lokusu byla opakována i na pozadí divokého *Rx* kmene z odlišného zdroje (*Rx<sub>Sp155</sub>*; *Sp155*), který byl úspěšně použit pro delecí *ftsA* v merodiploidním kmeni v jiné laboratoři (Mura et al., 2016). Podařilo se získat pozitivní klony, které byly rezistentní k Cm, a zároveň nerostly v nepřítomnosti  $Zn^{2+}$  iontů na KA. Počet získaných transformantů rezistentních k Cm a selektovaných v přítomnosti  $ZnCl_2$  o koncentraci 0,35 a 0,65 mM je uveden v Tab. 10. V přítomnosti 0,35 Mm  $ZnCl_2$  bylo získáno nejvíce transformantů. Nižší počet transformantů získaný selekcí v přítomnosti 0,65 mM  $Zn^{2+}$  iontů,



mohl být způsoben vlivem samotných zinečnatých iontů na životaschopnost bakteriální populace, což koreluje s výsledky růstových křivek (Obr. 28) merodiploidních kmenů, u kterých byl výrazně inhibován růst v přítomnosti 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub>. Nicméně po pasáži těchto deplečních kmenů (RX<sub>Sp155</sub> *ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA*; RX<sub>Sp155</sub> *ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A*) v BHI médiu, rostly tyto kmeny i v nepřítomnosti Zn<sup>2+</sup> v médiu, což bylo následně potvrzeno i na KA.

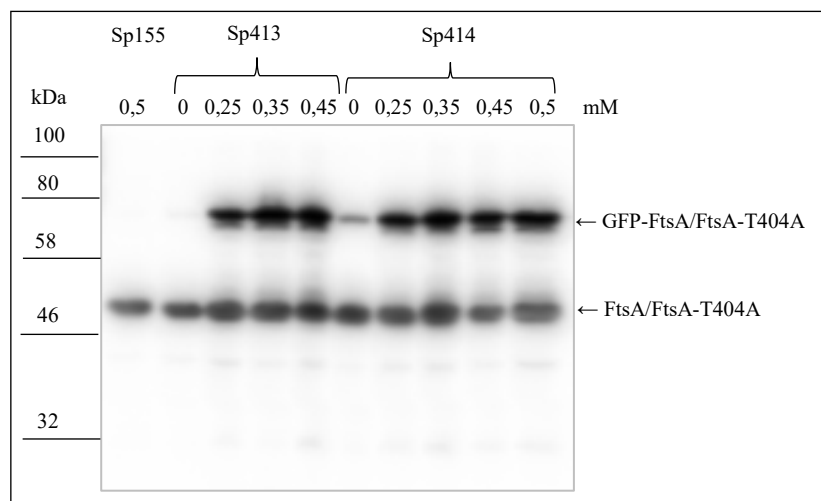
Za účelem ověření integrace delečního konstruktů s chloramfenikolovou kazetou do nativního lokusu genu *ftsA*, byly navrženy oligonukleotidy AU179 nacházející se na začátku chloramfenikolové kazety a LN167 ležící mimo rekombinovanou oblast, tedy mimo deleční konstrukt, v genu *ftsZ*. U pozitivních klonů byly amplifikovány fragmenty o předpokládané velikosti 1714 bp (Obr. 32). Pozitivní kontrolou byl kmen AM417 a negativní kmen Sp155 (WT), u kterého nebyl amplifikován žádný fragment. Vybrané pozitivní klony byly pojmenovány, **Sp413** klon č.4 (*ΔftsA bga::PczcD-gfp-ftsA*) a **Sp414** klon č.1 (*ΔftsA bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A*).

	průměr počtu získaných transformantů	
	kmen	
mM ZnCl <sub>2</sub>	Sp413	Sp414
0	0	0
0,35	64	63
0,65	38	49

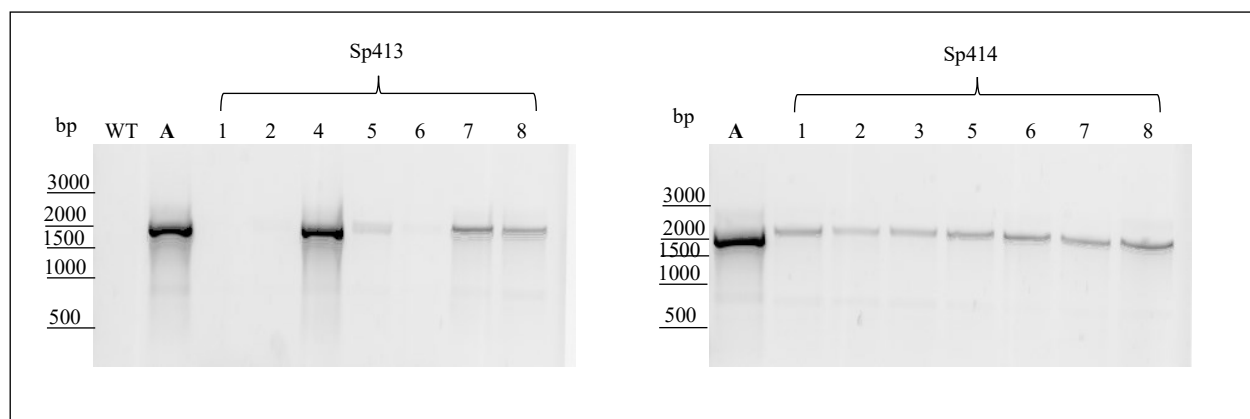
**Tab. 10. Průměr počtu transformantů.** Transformační směs (100 μl) kmenů Sp413 a Sp414 selektovaných na miskách s KA s chloramfenikolem a s přidavkem 0 nebo 0,35 nebo 0,65 mM ZnCl<sub>2</sub>.

Delece *ftsA* z nativního lokusu v přítomnosti Zn<sup>2+</sup> iontů a exprese proteinů fúzovaných s GFP, byla testována anti-FtsA imunodetekcí celkových buněčných lyzátů získaných chemickou dezintegrací buněk kmenů Sp413 a Sp414 (Obr. 31), kultivovaných v přítomnosti různých koncentrací ZnCl<sub>2</sub>. U obou deplečních klonů (RX<sub>Sp155</sub> *ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA*; RX<sub>Sp155</sub> *ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A*) byla detekována kolem 48 kDa přítomnost FtsA, resp. FtsA-T404A a v oblasti kolem 80 kDa GFP-FtsA, resp. GFP-FtsA-T404A forma proteinu. Jako kontrola byl použit divoký kmen Sp155 kultivovaný v přítomnosti 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>. Z Obr. 31 vyplývá, že přestože delece genu *ftsA* z nativního lokusu byla prokázána koloniovou

PCR, dochází u všech testovaných klonů k expresi nativní formy FtsA proteinu, a to jak u kmene Sp413, tak i u kmene Sp414.



**Obr. 31. Imunodetekce anti-FtsA protilátkou celkových buněčných lyzátů (1-DE, 12% gel).** Kmeny Sp413 a Sp414 kultivovány v přítomnosti různých koncentrací ZnCl<sub>2</sub> (0-0,5 mM). Sp155 (WT) – negativní kontrola kultivována v přítomnosti 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>. Velikosti standardu v kDa v levé části obrázku.



**Obr. 32. Výřez elektroforetogramu koloniové PCR kmenů Sp413 (klony 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8) a Sp414 (klony 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8).** Použité oligonukleotidy AU179, nacházející se na počátku chloramfenikolové kazety a LN167, nacházející se mimo rekombinovanou oblast. U pozitivních klonů byl amplifikován fragment o předpokládané velikosti 1714 bp. Pozitivní kontrolou byl kmen AM417 (R<sub>X</sub>Sp155 *ftsA::cat bga::PczcD-gfp-ftsA*) (A) a negativní Sp155 (WT), u kterého nebyl amplifikován žádný fragment. Standardy a jejich velikosti v bp uvedeny v levé části obrázků.

Z elektroforetogramů na Obr. 32 je patrné, že depleční konstrukt byl rekombinován do námi předpokládaného homologního úseku na chromozómu, tedy do originálního lokusu genu *ftsA*, a přesto nedošlo k odstranění nativní alely *ftsA* z chromozómu *S. pneumoniae*. Vzhledem k nezdaru odstranit gen *ftsA* z nativního lokusu *S. pneumoniae* nemohlo být ověřeno, zda je kmen *S. pneumoniae* kódující pouze mutovanou alelu *ftsA-T404A* životaschopný.

## 6. DISKUZE

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na identifikaci a ověření dalších možných substrátů jediné Ser-Thr proteinkinázy StkP u *S. pneumoniae*. Tento signalizační protein ovlivňuje převážně buněčné dělení a virulenci bakterie (Echenique *et al.*, 2004) a je tedy vhodným cílem pro budoucí potenciální terapeutický účel.

### 6.1. Substrát P15

První fáze experimentů byla zaměřena na fosfoproteom *S. pneumoniae*, zejména pak na identifikaci fosforylovaného proteinu nacházejícího se v oblasti kolem 15 kDa, který je právě pod kontrolou proteinkinázy StkP a proteinfosfatázy PhpP. V naší laboratoři byla v posledních letech provedena řada experimentů vedoucí k odhalení identity fosforylovaného nízkomolekulárního proteinu P15. Membránové proteiny byly děleny pomocí 1-DE a double SDS-PAGE, barveny pomocí CBB a příslušné proužky či spoty kolem 15 kDa byly vyříznuty z gelu a štěpeny trypsinem. Fosfopeptidy byly případně i obohaceny na TiO<sub>2</sub> kolonkách a analyzovány pomocí MALDI. Přestože se nepodařilo identifikovat žádný fosfopeptid, z přímé MALDI identifikace se nám opakovaně podařilo protein P15 identifikovat jako produkt genu *spr0595*, který je homologní se skupinou proteinů zvaných rodanázy.

Vhodným a používaným systémem pro studium substrátů kinázy StkP byla protilátka proti fosforylovanému Thr (polyklonální myši anti-P-Thr protilátka, kat. č. #9381, Cell Signalling), pomocí níž se v naší laboratoři již podařilo identifikovat fosforylaci substrátů jako např. DivIVA, LocZ (Nováková *et al.*, 2010) a Jag (Ulrych *et al.*, 2016). V rámci této práce bylo přistoupeno k metodě obohacení a izolace fosforylovaných proteinů pomocí této protilátky navázané na magnetických kuličkách (Safarik a Safarikova, 2004). V experimentech byl použit mutantní kmen  $\Delta phpP$ , v němž vlivem odstranění PhpP nedochází k defosforylaci substrátů kinázy StkP (Ulrych *et al.*, 2016) a celková fosforylace je tedy zvýšena. Z membránové frakce *S. pneumoniae*  $\Delta phpP$  byly tak fosfoproteiny na protilátku navázány a po následné separaci pomocí 1-DE identifikovány pomocí MALDI TOF. Technika separace pomocí 2-DE není vhodná pro dělení membránových proteinů z důvodu jejich hydrofobicity (Barry *et al.*, 2003).

Tímto přístupem se podařilo pomocí 1-DE separovat a detekovat více proteinových proužků, než na fosfotreoninovém imunoblotu. Celkově se nejedná pouze o fosforylované proteiny, ale i o bílkoviny, které se nespecificky navázaly na kolonku s imobilizovanou protilátkou, či na již navázané proteiny. Z toho důvodu byly ještě jednotlivé proteinové proužky

z gelu vyříznuty a znovu separovány pomocí 1-DE a detekovány anti-P-Thr protilátkou. Jak se ukázalo, byly opět potvrzeny známé substráty jako DivIVA, LocZ, Jag i samotná kináza StkP.

Z oblasti kolem proteinu P15 s molekulovou hmotností cca 17-22 kDa byly MS analýzou identifikovány proteiny rodanáza a 50S ribozomální proteiny L17 a L19. V okolí byly navíc zjištěny i bílkoviny jako ATP syntáza (beta podjednotka), 50S ribozomální protein L13 a 30S ribozomální protein S5.

Naše pozornost byla nicméně soustředěna na rodanázu Spr0595, která byla v této oblasti již dříve identifikována v naší laboratoři, a proto byla vybrána pro další experimenty, zejména pro ověření její fosforylace *in vivo*.

Spr0595 je transmembránový protein složený ze 126 aminokyselin, o teoretické velikosti 14,5 kDa. Obsahuje transmembránovou doménu (aminokyseliny 6-22) a rodanázovou doménu (aminokyseliny 39-124) (Obr. 33).

Enzymy rodanázy (thiosíran:kyanid sulfurtransferázy) jsou nejdéle známé, hodně studované a nejlépe pochopené sulfurtransferázy (ST) (Acosta et al., 2005). Jsou schopné katalyzovat přenos atomu síry z thiosíranu na kyanid podle rovnice:



Tyto enzymy jsou široce rozšířené u eukaryot, prokaryot i archebakterií (Westley, 1981). Rodanáze podobné proteiny jsou složeny buď z jediné katalytické rodanázové domény jako v případě GlpE a PspE (Spallarossa *et al.*, 2001) nebo jsou tyto proteiny složeny ze dvou rodanázových domén, z nichž ta C-terminální doména má domnělou katalytickou funkci. N-terminální doména je inaktivní a není esenciální pro katalytickou funkci proteinu (Fauman *et al.*, 1998). Dvě domény má například thiosulfát sulfurtransferáza RhdA *Azotobacter vinelandii* (Remelli *et al.*, 2012) nebo bovine liver rodanáza, jejíž dvě domény jsou skoro stejně velké, s téměř identickou konformací, ale odlišnou sekvencí aminokyselin (Ploegman *et al.*, 1978; Weng *et al.*, 1978). Dalším příkladem proteinu s rodanázovou doménou je protein YbbB *E. coli*, který má N-terminální rodanázovou doménu a C-terminální doménu s ATP-vazebným motivem. Tento protein je nezbytný pro zapojení selenu do tRNA (Wolfe *et al.*, 2003).

Rodanázové domény s katalytickou aktivitou jsou všestrannými přenašeči síry, jejichž funkce může být přizpůsobena různým regulačním a metabolickým drahám. Aktivní

C-terminální doména, tzv. katalytická smyčka obsahuje aktivní centrum o 6 aminokyselinách, z nichž první je vždy cystein (Cys), zodpovědný za katalytickou funkci (Cipollone *et al.*, 2007). Katalyticky neaktivní rodanázové domény, ve kterých je nahrazen cystein za jiný kyselý nebo nepolární aminokyselinový zbytek, se vyskytují ve spojení s jinými doménami, což pravděpodobně vypovídá o jejich jiné regulační funkci, nejspíše signalizační (Hofman *et al.*, 1998; Bordo a Bork, 2000; Spallarosa *et al.*, 2001). Příkladem jsou enzymy *E. coli* MAPK-fosfatáza nebo ThiL zapojené v biosyntéze thiaminu a thiouridinu (Spallarosa *et al.*, 2001). ThiL je esenciální pro zapojení atomu síry do 4-thiouridinu tRNAs (Mueller *et al.*, 2001). Nebo lidský protein MOCS3 s C-terminální rodanázovou doménou účastní se v přenosu síry během biosyntézy molybdopterinu (Matthies *et al.*, 2005).

V rodanázových doménách jsou vysoce konzervované aminokyselinové zbytky Tyr37 a His41 (Bordo a Bork, 2000), které by mohly být potencionálním cílem tyrosinové nebo histidinové kinázy (Bordo a Bork., 2002).

Dle sekvenčního srovnání má Spr0595 katalyticky neaktivní rodanázovou doménu, ve které se nachází místo katalyticky aktivního cysteinu katalyticky neaktivní kyselina glutamová (E) (Obr. 33).

```
MVTWILWALILAMLAWMGFNYLRIRRAAKIVDNEEFEEALIRTGQLIDLDRDPAEFHRKHILGARNI
PSSQLKTSLAALRKDKPVLLEYENQRAQRVTNAALYLKKQGFSEIYILSYGLDSWKGVKTS
```

**Obr. 33. Sekvence Spr0595.** Šedou barvu je vyznačena transmembránová doména. Zeleně je označena katalyticky inaktivní rodanázová doména. Žlutě zvýrazněná aminokyselina kyselina glutamová nahrazuje cystein v katalyticky neaktivních doménách.

Aby mohlo být *in vitro* ověřeno, zda je Spr0595 hledaným substrátem kinázy StkP, byla vytvořena deleční mutanta v tomto genu. Proteiny GlpE a PspE, sekvenční homology *spr0595* *E. coli*, nejsou esenciální a u mutantních kmenů dochází pouze ke snížení thiosulfát sulfurtransferázové aktivity (Cheng *et al.*, 2008), proto jsme předpokládali, že mutanta  $\Delta spr0595$  by mohla být životaschopná.

Po genetických manipulacích byla úspěšně připravena mutanta s delecí genu pro rodanázu, nicméně fosforylační profil byl identický s divokým typem a i v lyzátech mutantního kmene jsme pozorovali fosforylovaný substrát P15. Na základě těchto experimentů lze říci, že rodanáza není hledaným substrátem P15. Nicméně, nemůžeme vyloučit, že i Spr0595 je fosforylován, ale jeho fosforylace je slabá, případně zastíněna jinými kvantitativně početnějšími proteiny v této oblasti.

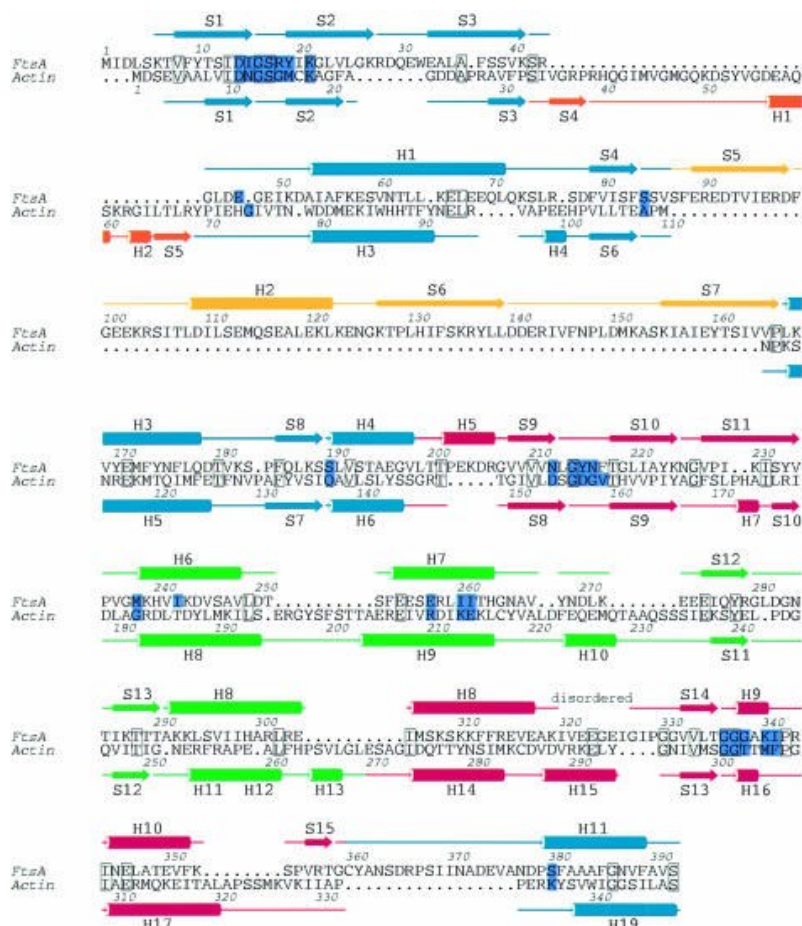
Vzhledem k nezdaru během identifikace nového substrátu kinázy StkP, se druhá část práce soustředila na již ověřený substrát StkP kinázy – protein FtsA (Beilharz *et al.*, 2012).

## 6.2. FtsA

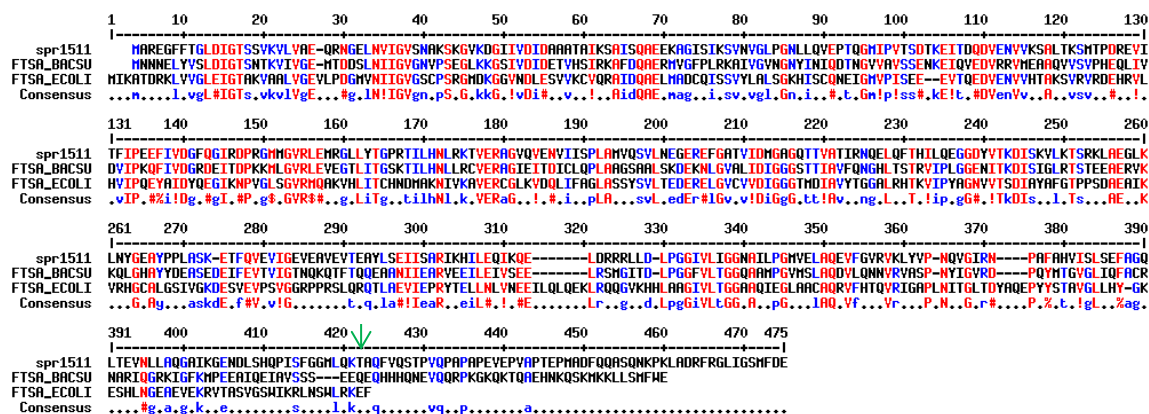
FtsA je cytoplazmatický, ATP-vázající protein, který je esenciální pro buněčné dělení (Paradis-Bleau, *et al.*, 2005). FtsA patří do proteinové rodiny aktin/Hsp70. Proteiny patřící do této skupiny proteinů mají podobnou strukturu, nicméně mají rozdílnou funkci (Bork *et al.*, 1992). Jsou složeny ze čtyř subdomén 1a, 1b, 2a a 2b. Strukturně je FtsA nejvíce podobný aktinu, nicméně se od aktinu a ostatních aktinu podobných proteinů liší nepřítomností subdomény 1b, místo níž se na opačném konci molekuly nachází subdoména 1c (Obr. 34) (van den Ent *et al.*, 2000), která je zodpovědná za vazbu dalších proteinů buněčného dělení (Corbin *et al.*, 2004; Rico *et al.*, 2004; Busiek *et al.*, 2012; Pichoff *et al.*, 2015).

Subdoména 2b obsahuje aminokyselinové zbytky, které jsou nezbytné k interakci FtsA s FtsZ (Pichoff a Lutkenhaus, 2007). Polymerizace FtsA je důležitá pro funkci proteinu *in vivo* (Pichoff a Lutkenhaus, 2005; Pichoff *et al.*, 2012) a je umožněna skrz subdomény 2b (S12 a S13  $\beta$ -strands) a 1c (Krupka *et al.*, 2012; Pichoff *et al.*, 2012; Szwedziak *et al.*, 2012). Na C-terminálním konci FtsA je umístěn konzervovaný motiv (van den Ent a Löwe, 2000) nazvaný MTS („membrane targeting sequence“), tvořící konzervovaný amfipatický helix a lokalizující FtsA do membrány (Yim *et al.*, 2000; Pichoff a Lutkenhaus, 2005). Esencialita C-terminálního konce pro ukotvení FtsA do membrány, byla prokázána u *E. coli* (Yim *et al.*, 2000) i u *S. pneumoniae* (Krupka *et al.*, 2014).

Cílem této části práce bylo ověřit místo fosforylace na proteinu FtsA. V globální fosfoproteomové studii *S. pneumoniae*, kde bylo pomocí TiO<sub>2</sub> obohacení v kombinaci s LC-MS analýzou identifikováno 84 proteinů fosforylovaných na serinových, treoninových a tyrosinových aminokyselinových zbytcích, byly také identifikovány fosforylované aminokyselinové zbytky proteinu FtsA: S113, T116 a T160 (Sun *et al.*, 2010). V další studii byly připraveny jednoduché mutanty s fosfoablativními záměnami v těchto identifikovaných fosforylovaných aminokyselinových zbytcích S113A, T116A, T160A a dvojitá mutanta T116A/T160A. *In vitro* kinázovou reakcí purifikovaných mutovaných proteinů s následnou fosfotreoninovou imunodetekcí bylo ukázáno, že ačkoliv jsou tyto proteiny fosforylovány v přítomnosti kinázové domény kinázy StkP, vytvořené fosfoablativní záměny nemají vliv na fosforylaci těchto proteinů a tudíž nebylo potvrzeno, že by zbytky S113A, T116A, T160A byly fosforylovány proteinkinázou StkP (Beilharz *et al.*, 2012).



Obr. 34. Srovnání sekvencí FtsA (*T. maritima*) a aktinu a zobrazení subdomén. Modře je označena subdoména 1a, fialově 2a, zeleně 2b, žlutě 1c, červeně 1b. Modře zvýrazněné sekvenční oblasti představují aktivní místa proteinů. Převzato z van den Ent a Löwe, 2000.



Obr. 35. Sekvenční srovnání FtsA *S. pneumoniae* (spr1511), *B. subtilis* (FTSA\_BACSU) a *E. coli* (FTSA\_ECOLI). Červeně jsou označeny sekvenční oblasti s vysokou podobností (min. 90 %), modře s nízkou podobností (min. 40 %). Zelenou šipkou je označeno fosforylační místo T404. FtsA doména – aminokyseliny 1-374; MTS doména – aminokyseliny 375-475. Vytvořeno pomocí NCBI.

V nedávné době bylo v naší laboratoři v rámci fosfoproteomové studie identifikováno další fosforylované místo proteinu FtsA - treonin v pozici 404 (nepublikovaná data). T404 se nachází na C-terminálním konci proteinu v MTS doméně (Obr. 35). Zaměřili jsme se proto na přípravu mutanty, ve které byla vytvořena fosfoablativní záměna treoninu 404 za alanin. Alanin nemůže být vzhledem ke své struktuře fosforylován a v důsledku této mutace by nemělo docházet k fosforylaci FtsA, případně by měla být fosforylace snížena, pokud je ve FtsA fosforylováno zbytků více. Proteiny FtsA i FtsA-T404A a kinázová doména StkP, fúzané s His-kotvou byly exprimovány v *E. coli* a v nativním stavu purifikovány použitím NiNTA afinitní chromatografie (QIAGEN). Čistota purifikovaných proteinů byla ověřena rozdělením pomocí 1-DE a obarvením CCB. S každým purifikovaným proteinem, byly kopurifikovány jiné proteiny, nejspíše vlivem meziproteinových interakcí či nespecifické vazby na NiNTA nosič. Tyto proteiny byly ale ve vzorku zastoupeny v zanedbatelném množství. Proteiny FtsA a FtsA-T404A migrovaly na 1-DE i na 2-DE gelu ve dvou majoritních proteinových prouzcích o rozdílné velikosti 46 a 50 kDa. Migrace FtsA v gelu ve dvou různých formách byla popsána i v jiné studii (Lara *et al.*, 2005), ve které byl FtsA *S. pneumoniae* purifikován z expresních kmenů *E. coli* a následně separován v SDS-PAGE gelu. Přítomnost dvou různě migrujících forem FtsA může být způsobena buď částečnou degradací proteinu nebo nějakou posttranslační modifikací.

S purifikovanými proteiny byla provedena *in vitro* kinázová reakce v přítomnosti kinázové domény StkP (StkP-KD). Samotná StkP-KD byla úspěšně použita pro *in vitro* ověření fosforylace proteinů DivIVA a LocZ (Nováková *et al.*, 2010). Pokusy s aktivní StkP-KD potvrdily, že nativní forma FtsA i mutovaná forma proteinu FtsA-T404 jsou touto kinázovou doménou *in vitro* fosforylovány, nicméně jsme detekovali různý počet fosforylovaných izoform. U nativní formy FtsA byly detekovány 3 fosforylované formy proteinu. Dvě fosforylované izoformy proteinu FtsA byly detekovány v obl. 50 kDa (č. I a II) a jedna v oblasti 46 kDa (č. III) (Obr. 18A). Oproti tomu, u mutované formy proteinu FtsA-T404A byly po kinázové reakci detekovány pouze 2 fosforylované izoformy, jedna v oblasti 50 kDa (č. II) a druhá v oblasti 46 kDa (č. III). Tři izoformy fosforylovaného FtsA proteinu byly vidět i na 1-DE gelu barveném CCB. Chybějící fosforylovaná izoforma FtsA-T404A č. I v oblasti 50 kDa tedy naznačuje, že T404 je skutečně fosfoakceptorovým zbytkem. Anti-FtsA protilátkou byl u nativní i mutované formy proteinů v oblasti 50 kDa detekován pouze jeden signál. Izoforma č. I dle barvení CCB byla zastoupena ve velmi malém množství, a tudíž pravděpodobně nebyla detekována anti-FtsA protilátkou. Anti-P-Thr protilátka je citlivější, je tedy schopná detekovat



i méně zastoupené proteiny. Tento výsledek byl potvrzen i separací pomocí 2-DE, kde u fosforylovaného FtsA-T404A chyběly tři proteinové spoty, odpovídající izoformě č. I v oblasti 50 kDa (Obr. 20), které byly u nativní formy proteinu vyříznuty a společně se spoty z oblasti 46 kDa (pravděpodobně degradační produkty proteinu), které byly fosforylovány u obou forem proteinu, odeslány na LC-MS analýzu. Bohužel v době sepisování této práce nebyly výsledky stále vyhotoveny. Ve vzorku, který nebyl inkubován s StkP-KD byla po 2-DE separaci detekována zbytková fosforylace proteinu, která mohla být způsobena fosforylací proteinu v *E. coli*, z něhož byl protein purifikován. *E. coli* sice nekóduje žádnou eSTKPs (Galperin *et al.*, 2010), nicméně kóduje jiné typy proteinkináz, které fosforylují serin a treonin. Zbytková fosforylace by mohla být také vysvětlena nespecifickou interakcí protilátky, způsobené nadměrnou nanáškou FtsA na gel.

Cílem následujících pokusů bylo ověřit, zda jsou proteiny FtsA a FtsA-T404A fosforylovány kinázou StkP v podmínkách *in vivo* a zda je kmen kódující pouze ektopickou kopii mutovaného genu *ftsA-T404A* životaschopný.

Vzhledem k vytyčeným cílům a esencialitě FtsA u *S. pneumoniae* (Lara *et al.*, 2005), musely být připraveny merodiploidní kmeny, které obsahovaly dvě kopie genu *ftsA*. Nativní *ftsA* v nativním lokusu a jeho ektopickou kopii nativní nebo mutované alely *ftsA* v lokusu *bgaA* pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru (PZn). Pomocí těchto merodiploidních kmenů mohl být poté v přítomnosti  $Zn^{2+}$  odstraněn esenciální gen *ftsA* z nativního lokusu. Vkládané ektopické kopie byly fúzovány s GFP, což umožnilo určit lokalizaci v buňce a jejich následnou purifikaci afinitní chromatografií. U připravených merodiploidních kmenů Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA* a Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A* byla testována exprese proteinů GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A, které byly kódovány pod kontrolou PZn promotoru. Ve vzorcích získaných z bakterií kultivovaných v přítomnosti  $Zn^{2+}$  byla anti-FtsA protilátkou detekována přítomnost jak nativní formy FtsA v oblasti 50 kDa, tak i GFP-FtsA v oblasti 80 kDa. Také bylo zjištěno, že GFP-FtsA-T404A je po přidání induktoru exprimován s nižší účinností než GFP-FtsA. To naznačuje, že mutace T404A nějakým způsobem ovlivňuje stabilitu proteinu. U merodiploidních kmenů Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA*, Rx *bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A* a Rx<sub>Sp155</sub> *bga::PczcD-gfp-ftsA* a Rx<sub>Sp155</sub> *bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A* bylo testováno, zda dochází k fenotypovým změnám po indukci nadprodukce FtsA. U těchto merodiploidních kmenů kultivovaných ve vyšších koncentracích  $ZnCl_2$  (0,5 a 0,65 mM) byl zaznamenán změněný fenotyp způsobený zřejmě nadprodukcí FtsA/FtsA-T404A, kde byly pozorovány shluky GFP signálu v oblastech pólů buněk

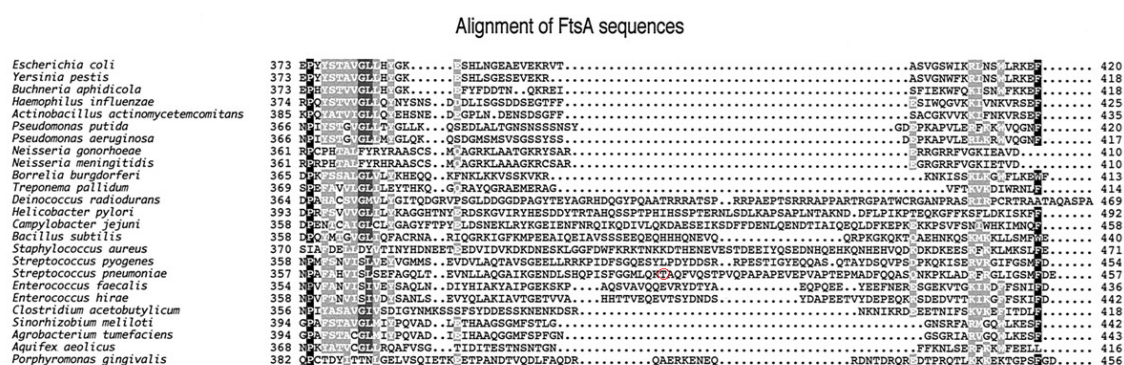
způsobených pravděpodobně agregací těchto nadprodukovaných proteinů. V předešlé studii byla lokalizace FtsA sledována použitím imunoelektronové a imunofluorescenční mikroskopie, ve které bylo detekováno u divokého kmene *S. pneumoniae* na pólech buněk pouze 10 % celkového FtsA v buňce (Lara *et al.*, 2005). U studovaných kmenů byla měřena velikost buněk, a dle statistického neparametrického Mann-Whitneyho testu dochází ke statisticky významnému zmenšování buněk v závislosti na nadprodukci FtsA. Tyto výsledky naznačují, že nadprodukce FtsA negativně ovlivňuje prodlužovací fázi růstu *S. pneumoniae* a pravděpodobně vede k účinnější septaci. Podobné výsledky byly zaznamenány i v případě nadprodukce FtsA-T404A, což ukazuje, že absence fosforylace T404 nemá výrazný vliv na tento fenotyp.

Pomocí afinitní chromatografie provedené pomocí soupravy GFP-Trap®\_MA byly purifikovány z merodiploidních kmenů *Rx bga::PczcD-gfp-ftsA*, *Rx bga::PczcD-gfp-ftsA-T404A* a *Rx ΔstkP bga::PczcD-gfp-ftsA* kultivovaných v médiu v přítomnosti  $Zn^{2+}$  proteiny GFP-FtsA a GFP-FtsA-T404A. Následně byla provedena detekce fosforylace protilátkou anti-P-Thr a bylo potvrzeno, že GFP-FtsA je fosforylován *in vivo*, nicméně GFP-FtsA-T404A byl fosforylován s nižší intenzitou. Tyto výsledky naznačují, že T404 je fosforylován v přítomnosti StkP, nicméně protein obsahuje další dosud neidentifikovaný fosfoakceptorový Thr zbytek. Přestože proteinu GFP-FtsA-T404A bylo izolováno méně oproti GFP-FtsA bylo kvantifikací fosforylačního signálu, normalizovaného k celkovému množství proteinu zjištěno, že FtsA-T404A je fosforylován o 68 % méně než FtsA. Tento výsledek koresponduje s výsledky *in vitro* kinázové reakce proteinu FtsA-T404A, kde byl tento protein celkově fosforylován rovněž méně než divoká forma FtsA. Aby mohlo být ověřeno, že je fosforylace způsobena kinázou StkP byl jako negativní kontrola izolován protein GFP-FtsA z kmene  $\Delta stkP$ , kde není detekována Thr fosforylace. U tohoto proteinu byl při kvantifikaci zaznamenán nevýznamný zbytkový signál.

Na P-Thr imunoblotu byl také detekován fosforylační signál neznámého kopurifikovaného proteinu v oblasti mezi 32 a 46 kDa. Dle velikosti by se mohlo jednat o DivIVA nebo Jag, které mohou s FtsA interagovat (Fadda *et al.*, 2007).

Aminokyselinový zbytek T404 se nachází na C-terminálním konci proteinu. Na C-terminálním konci FtsA *S. pneumoniae* je oblast amfipatického helixu, působící jako

ATP-dependentní spínač, který inhibuje polymerizaci FtsA v cytoplazmě.



Obr. 36. Srovnání sekvence C-terminálního konce FtsA různých bakteriálních druhů. Červeně je vyznačena pozice T404 *S. pneumoniae*. Převzato z Yim *et al.*, 2000.

Po vazbě ATP dojde k vazbě helixu na membránu, kde zároveň dojde k polymerizaci proteinu. Po odstranění posledních 52 aminokyselinových zbytků z C-terminálního konce FtsA *S. pneumoniae* polymerují tyto proteiny v *in vitro* podmínkách rychleji než nativní FtsA. MTS („membrane targeting sequence“) nacházející se na C-terminálním konci, tedy zpomalují polymerizaci *in vitro*, nemají však vliv na finální množství polymerů. To ovlivňuje pouze koncentrace přítomných proteinů. MTS mají ale vliv na strukturu. Proteiny FtsA s odstraněným C-terminálním koncem tvoří pravidelnější a kompaktnější struktury oproti celému FtsA, což nasvědčuje tomu že C-terminální konec slouží jako strukturní inhibitor polymerizace (Krupka *et al.*, 2014). Dle sekvenčního srovnání (Obr. 36), obsahuje C-konec FtsA odpovídající doméně MTS dva konzervované úseky a variabilní oblast umístěnou mezi nimi. FtsA *S. pneumoniae* obsahuje poměrně dlouhou variabilní oblast, která nevykazuje homologii s jinými FtsA proteiny. T404 je lokalizován právě v této oblasti a jeho fosforylace tedy představuje způsob regulace zřejmě jedinečný pro pneumokoka.

Aby mohlo být ověřeno, zda je kmen *S. pneumoniae* kódující pouze ektopickou kopii FtsA-T404A životaschopný, musel být odstraněn *ftsA* z nativního lokusu. Jelikož je gen *ftsA* esenciální (Lara *et al.*, 2005; Mura *et al.*, 2016), byla deplece provedena na pozadí merodiploidního kmene v přítomnosti  $Zn^{2+}$ . V nedávných studiích bylo konstruktem *ftsA::P<sub>lessCat</sub>* úspěšně odstraněno FtsA z nativního lokusu na pozadí  $Rx_{Sp155}$  kmene a byly získány chloramfenikol rezistentní kmeny, které nerostly v nepřítomnosti  $Zn^{2+}$  (Mura *et al.*, 2016).

Do merodiploidních kmenů s různým genetickým pozadím ( $Rx$ ,  $Rx_{Sp155}$ ,  $R6$ ) byl transformován deleční konstrukt *ftsA::P<sub>lessCat</sub>* (Mura *et al.*, 2016), nesoucí chloramfenikolovou rezistenci a sekvence nutné pro homologní rekombinaci v místě genu *ftsA*. Konstrukt byl

navržen tak, že gen *ftsA* nebyl odstraněn celý, nýbrž C-terminální část genu zůstala zachována. Životaschopnost deplečních kmenů byla testována kultivací v přítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$  a bez něj. Depleční kmeny by neměly růst v nepřítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$ , jelikož esenciální gen *ftsA* z nativního lokusu by měl být odstraněn a jeho ektopická kopie v *bgaA* lokusu je kontrolována inducibilním PZn promotorem. Na pozadí R6 kmene byly získány chloramfenikol rezistentní klony, které ale všechny rostly i v nepřítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$ . O něco lepších výsledků bylo dosaženo transformací do Rx kmene, kde byly také získány chloramfenikol rezistentní kmeny, z nichž asi jen 12 % bylo pozitivních, nerostly bez přítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$  v médiu. Sekvenací byla u pozitivního deplečního Rx kmene potvrzena přítomnost delečního fragmentu v místě genu *ftsA*. Tyto depleční kmeny bylo ale možné kultivovat pouze na miskách s KA s přídavkem  $\text{Zn}^{2+}$ . V tekutém médiu nebyly schopné růstu.

Transformací konstruktů *ftsA::P<sub>less</sub>cat* do merodiploidních kmenů na pozadí Rx<sub>Sp155</sub> se podařilo získat chloramfenikol rezistentní klony, z nichž 100 % bylo pozitivních a nerostly na KA bez přídavku  $\text{Zn}^{2+}$ , nicméně po pasáži v BHI médiu bylo zjištěno, že všechny pozitivní kmeny rostou i bez přítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$  v médiu, což bylo potvrzeno následným přeočkováním také na krevní agar. Koloniovou PCR byla potvrzena integrace chloramfenikolové kazety do námi předpokládané oblasti na chromozómu. Nicméně anti-FtsA imunodetekcí celkových buněčných lyzátů těchto Rx<sub>Sp155</sub> deplečních kmenů bylo zjištěno, že je v buňce přítomen jak FtsA exprimovaný z nativního lokusu tak GFP-FtsA exprimovaný pouze v přítomnosti  $\text{Zn}^{2+}$ . *S. pneumoniae* je geneticky velmi flexibilní a snadno akumuluje supresorové mutace (Massidda *et al* 2013). Jelikož použitý deleční konstrukt obsahuje část genu *ftsA*, je pravděpodobné, že ačkoliv došlo k integraci antibiotikové kazety, nastaly další, dosud neidentifikované genetické změny, které vedly k zachování jinak esenciálního genu *ftsA*. Vzhledem k těmto problémům, nebyla ověřena životaschopnost mutantního kmene kódující pouze ektopickou alelu genu *ftsA-T404A*.

## 7. SOUHRN

Výsledky diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Identifikace proteinu P15, neznámého substrátu kinázy StkP *S. pneumoniae* pomocí hmotnostní spektrometrie se nepodařila. Protein rodanáza (Spr0595) neodpovídá hledanému substrátu P15.
- Kinázovou reakcí purifikovaných proteinů byla ověřena *in vitro* fosforylace proteinů FtsA a FtsA-T404A *S. pneumoniae* kinázou StkP, a to s rozdílným fosforylačním profilem, který naznačuje, že jedním z fosforylovaných aminokyselinových zbytků je T404.
- U merodiploidních kmenů *S. pneumoniae* kódujících *ftsA* v nativním lokusu a *ftsA* nebo *ftsA-T404A* v *bgaA* lokusu pod kontrolou zinkového indukibilního promotoru byly u buněk kultivovaných v přítomnosti  $Zn^{2+}$  pozorovány fenotypové změny. Vlivem nadprodukce indukovaných proteinů docházelo ke zmenšování buněk a ke změně lokalizace těchto proteinů – byly pozorovány výrazné shluky nadprodukovaných GFP fúzovaných proteinů v oblasti buněčného pólu. Z tohoto pozorování lze odvodit, že přestože mutovaná forma proteinu FtsA-T404A disponuje sníženou expresí oproti divoké formě FtsA, absence fosforylace T404 nemá výrazný vliv na fenotyp *S. pneumoniae*.
- Imunodetekcí purifikovaných proteinů byl protein FtsA v *in vivo* podmínkách potvrzen jako substrát kinázy StkP. Mutovaná forma proteinu FtsA-T404A byla fosforylována s výrazně nižší intenzitou, což nasvědčuje skutečnosti, že kromě hlavního místa fosforylace T404 je protein fosforylován kinázou ještě na dalším minoritním neznámém aminokyselinovém zbytku.
- Nepodařilo se připravit depleční kmeny kódující pouze jednu kopii genu *ftsA* nebo *ftsA-T404A* pod kontrolou zinkového indukibilního promotoru a tudíž ani ověřit životaschopnost deplečního kmene kódujícího pouze *ftsA-T404A*.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Acosta, M., Beard, S., Ponce, J., Vera, M., Mobarec, J.C., Jerez, C.A. (2005): Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *A Journal of Integrative Biology* 9(1): 13–29.
- Addinal, S.G., Cao, C. Lutkenhaus, J. (1997): FtsN, a late recruit to the septum in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 25: 303-309.
- Addinal, S.G., Lutkenhaus, J. (1996): FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J Bacteriol.* 178: 7167-7172.
- Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., Pancholi, V. (2012): Strain-specific regulatory role of eukaryote-like serine/threonine phosphatase in pneumococcal adherence. *Infect Immun.* 80(4): 1361-1372.
- Ahn, K.C., Kim, H., McCoy, M.R., Gee, S.J., Hammock, B.D. (2011): Immunoassays and biosensors for monitoring environmental and human exposure to pyrethroid insecticides. *Food Chem.* 59: 2792–2802.
- Alloing, G., Martin, B., Granadel, C.H., Claverys, J-P (1998): Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Mol Microbiol.* 29: 75–83.
- Alpert, A.J. (1990): Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr.* 499:177-196.
- Andersson, L., Porath, J. (1986): Isolation of phosphoproteins by immobilized metal ( $\text{Fe}^{3+}$ ) affinity chromatography. *Anal Biochem.* 154: 250–254.
- Angert, E. R. (2005): Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 214-224.
- Av-Gay, Y. Everett, M. (2000): The eukaryotic-like Ser/ Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 8: 238–244.
- Ayala, J.A., Garrido, T., De Pedro, M.A., Vicente, M. (1994): Molecular biology of bacterial septation. *New Comprehensive Biochem.* 27: 73-101.

- Banu, L.D., Conrads, G., Rehrauer, H., Hussain, H., Allan, E., van der Ploeg, J.R. (2010): The *Streptococcus mutans* serine/threonine kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production, and cell wall metabolism. *Infect Immun* 78: 2209-2220.
- Barendt, S.M., Sham, L.T., Winkler, M.E. (2011): Characterization of mutants deficient in the L,D-carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) regulon, involved in peptidoglycan maturation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. *J Bacteriol* 193: 2290–2300.
- Barry, R.C., Alsaker, B.L., Robison-Cox, J.F, Dratz, E.A. (2003): Quantitative evaluation of sample application methods for semipreparative separations of basic proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 24: 3390-3404.
- Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., Cohen-Gonsaud, M. (2010): The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure* 18(5): 606-15.
- Beall, B., Lutkenhaus, J. (1992): Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. *J Bacteriol.* 174: 2398–2403.
- Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J.E., Villen, J., Li, J.X., Cohn, M.A., Cantley, L.C., Gygi, S.P. (2004): Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12130–12135.
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (1996): *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil. 558 s.
- Beilharz, K., Novakova, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., Veening, J.W. (2012): Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 905–913.
- Bendezú, F.O., de Boer, P.A. (2008): Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in mre and mrd shape mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 190: 1792–1811.
- Bendezú, F.O., Hale, C.A., Bernhardt, T.G., de Boer, P.A. (2009): RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *EMBO J.* 28: 193-204.
- Bi, E.F., Lutkenhaus, J. (1991): FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354(6340): 161-164.

- den Blaauwen, T., de Pedro, M.A., Nguyen-Distèche, M., Ayala, J.A. (2008): Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 321–344.
- Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Mueller, M., Domon, B., Aebersold, R. (2007): Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nature Methods* 4: 231-237.
- de Boer, P.A. (2010): Advances in understanding *E. coli* cell fission. *Curr Opin Microbiol.* 13: 730–737.
- de Boer, P., Crossley, R., Rothfield, L. (1992): The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature.* 359(6392): 254-256.
- Bordo, D., Bork, P. (2002): The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO reports* 3(8):741-746.
- Bork, P., Sander, C., Valencia, A. (1992): An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7290–7294.
- Bremer, M., Smits, N., Haasnoot, W. (2009): Biosensor immunoassay for traces of hazelnut protein in olive oil *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 119–126.
- Busiek, K.K., Eraso, J.M., Wang, Y., Margolin, W. (2012): The early divisome protein FtsA interacts directly through its 1c subdomain with the cytoplasmic domain of the late divisome protein FtsN. *J Bacteriol.* 194: 1989–2000.
- Busiek, K.K., Margolin, W. (2015): Bacterial actin and tubulin homologs in cell growth and division. *Curr Biol.* 25(6): 243-254.
- Canova, M.J., Kremer, L., Molle, V. (2008): pETPhos: a customized expression vector designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their substrates. *Plasmid* 60(2): 149-153.
- Carballido-López, R., Formstone, A. (2007): Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 10: 611–616.
- Cipollone, R., Ascenzi, P., Visca, P. (2007): Common themes and variations in the Rhodanese superfamily. *IUBMB Life* 59(2): 51-59.



- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., Edwards, D.H. (2008): Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 68: 1029–1046.
- Cleverley, R. M., Rismondo, J., Lockhart-Cairns, M. P., Van Bentum, P. T., Egan, A. J.F., Vollmer, W., Halbedel, S., Baldock, C., Breukink, E., Lewis R. J. (2016): Subunit arrangement in GpsB, a regulator of cell wall biosynthesis. *Microbial Drug Resistance* 22(6): 446-460.
- Cohen, P. (1982): The role of proteinphosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296: 613–620.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (1998): Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537–544.
- Collins, M.O., Yu, L., Coba, M.P., Husi, H., Campuzano, I., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., Grant, S.G.N. (2005): Proteomic analysis of *in vivo* phosphorylated synaptic proteins. *J Biol Chem.* 280: 5972–5982.
- Corbin, B.D., Geissler, B., Sadasivam, M., Margolin, W. (2004): Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J Bacteriol.* 186(22): 7736-7744.
- Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K. J., Gordhan, B. G., Betts, J. C., Mizrahi, V., Smith, D. A., Stokes, R. W., Av-Gay, Y. (2004): The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. *Mol. Microbiol.* 52: 1691–1702.
- Dai, K., Lutkenhaus, J. (1992): The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174: 6145–6151.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., Barford, D. (1996): Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.* 15(24): 6798–809.

- De Las Rivas, B., Garcia, J.L., Lopez, R., Garcia, P. (2002): Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol.* 184: 4988–5000.
- Deol, P., Vohra, R., Saini, A. K., Singh, A., Chandra, H., Chopra, P., Das, T. K., Tyagi, A. K., Singh, Y. (2005): Role of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division. *J Bacteriol.* 187: 3415–3420.
- Din, N., Quardokus, E.M., Sackett, M.J., Brun, Y.V. (1998): Dominant C-terminal deletions of FtsZ that affect its ability to localize in *Caulobacter* and its interaction with FtsA. *Mol Microbiol.* 27: 1051–1063.
- Dubrovskaya, A., Souchelnytskyi, S. (2005): Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography. *Proteomics* 5: 4678-4683.
- Duman, R., Ishikawa, S., Celik, I., Strahl, H., Ogasawara, N., Troc, P., Löwe, J., Hamoen, L.W. (2013): Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(48): 4601–4610.
- Dunn, J.D., Reid, G.E., Bruening, M.L. (2010): Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 29: 29-54.
- Dyballa, N., Metzger, S. (2009): Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp.* (30). pii: 1431.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., Veening, J.W. (2009): Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol.* 74(2): 395-408.
- Egan, A.J., Vollmer, W. (2013): The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci.* 1277: 8–28.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W., Trombe, M.C. (2004): Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 72: 2434–2437.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Löwe, J. (2001): Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413: 39–44.
- van den Ent, F., and Löwe, J. (2000): Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* 19: 5300-5307.

- Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010): FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74: 504–528.
- Errington, J., Daniel, R.A., Scheffers, D.J. (2003): Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 52–65.
- Esteve-Turrillas, F.A., Abad-Fuentes, A., Mercader, J.V. (2011): Site-heterologous haptens and competitive monoclonal antibody-based immunoassays for pyrimethanil residue analysis in foodstuffs *Food Chem.* 124: 1727–1733.
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M.B., Anderluzzi, D., Domenici, E., Massidda, O. (2003): Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 185: 6209-6214.
- Fadda, D., Santona, A., D’Ullisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M.G., Whalen, M.B., Massidda, O. (2007): *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol.* 189: 1288–1298.
- Falk, S.P., Weisblum, B. (2013): Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol Lett.* 340(1): 19-23.
- Falord, M., Mäder, U., Hiron, A., De’barbouillé, M., Msadek, T. (2011): Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR Rrgulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. *PLoS ONE* 6(7): e21323.
- Fauman, E.B., Cogswell, J.P., Lovejoy, B., Rocque, W.J., Holmes, W., Montana, V.G., Piwnicka-Worms, H., Rink, M.J., Saper, M.A. (1998): Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* 93: 617-625.
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D., Errington, J. (2001): Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 40: 115-125.
- Feng, S., Ye, M., Zhou, H., Jiang, X., Jiang, X., Zou, H., Gong, B. (2007): Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 1656-1665.
- Flaherty, K. M., Deluca-Flaherty, C., McKay, D. B. (1990): Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346: 623-628.

- Flaherty, K. M., McKay, D. B., Kabsch, W., Holmes, K. C. (1991): Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5041-5045.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.M., Grangeasse, C. (2012): Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 83: 746–758.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., Macek, B., Kuru, E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Di Guilmi, A., Claverys, J.P., Galinier, A., Grangeasse, C. (2014): Interplay of the serine/threonine - kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* 10(4): e1004275.
- Galperin, M.Y., Higdon, R., Kolker, E. (2010): Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst.* 6: 721–728.
- Gamba, P., Veening, J.W., Saunders, N.J., Hamoen, L.W., Daniel, R.A. (2009): Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol.* 191: 4186–4194.
- Garcia, P., Gonzalez, M.P., Garcia, E., Lopez, R., Garcia, J.L. (1999): LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol.* 31: 1275-1277.
- Garnak, M., Reeves, H.C. (1979): Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* 203: 1111–1112.
- Gerdes, K. (2009): RodZ, a new player in bacterial cell morphogenesis. *EMBO J.* 28: 171-172.
- Gething, M. J., Sambrook, J. (1992): Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-42.
- Gieffing, C., Jelencsics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., Nagy, E. (2010): The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ in vitro. *Microbiology* 156: 1697–1707.
- Gieffing-Kröll, C., Jelencsics, K. E., Reipert, S., Nagy, E. (2011): Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain-containing proteins. *Microbiology* 157: 1897–1909.
- Goehring, N.W., Beckwith, J. (2005): Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol.* 15: 514–526.

- Gomori, G., Benditt, E.P. (1953): Precipitation of calcium phosphate in the histochemical method for phosphatase. *J Histochem Cytochem.* 1: 114–122.
- Gorg, A., Drews, O., Lück, C., Weiland, F., Weiss, W. (2009): 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 30: 122–132.
- Griffith, F. (1928): The significance of Pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* 27: 113–159.
- Grodzki, A.C., Berenstein, E. (2010): Introduction to the purification of antibodies. *Methods Mol Biol.* 588: 11-13.
- Grønborg, M., Kristiansen, T.Z., Stensballe, A., Andersen, J.S., Ohara, O., Mann, M., Jensen, O.N., Pandey, A. (2002): A mass spectrometrybased proteomic approach for identification of serine/threoninephosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies-identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase a substrate. *Mol Cell Proteomics* 1:517–527.
- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y., Aebersold, R. (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresisbased proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9390–9395.
- Hale, C. A., de Boer, P. A. (1997): Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* 88: 175-185.
- Hanks, S.K., Hunter, T. (1995): Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576–96.
- Hempel, A. M. Cantlay, S., Molle, V., Wang, S., Naldrett, M.J., Parker, J.L., Richards, D.M., Jung, Y., Buttner, M.J., Flärdh, K. (2012): The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 2371–2379.
- Higgins, M.L., Shockman, G.D. (1976): Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells. *J Bacteriol.* 127: 1346-1358.
- Higgins, M.L., Shockman, G.D. (1970): Model for cell wall growth of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 101: 643–648.

- Hofmann, K., Bucher, P., Kajava, A.V. (1998): A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *J Mol Biol.* 282(1): 195-208.
- Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroňová, O., Ulrych, A., Branny, P. (2015): LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in *Streptococcus pneumoniae*. *mBIO* 6(1): e01700-14.
- Holmes-Davis, R., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., McCormick, S. (2005): Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 5: 4864–4884.
- Horvath, C.G., Preiss, B.A., Lipsky, S.R. (1967): Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal. Chem.* 39: 1422–1428.
- Huang, K.H., Durand-Heredia, J., Janakiraman, A. (2013): FtsZ-ring stability: of bundles, tubules, crosslinks and curves. *J Bacteriol.* 195: 1859–1868.
- Hurley, J.H. (1996): The sugar kinase/heat shock protein 70/ actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 25: 137–162.
- Hussain, H., Branny, P., Allan, E. (2006): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 188: 1628-1632.
- Chawla, Y., Upadhyay, S., Khan, S., Nagarajan, S.N., Forti, F., Nandicoori, V.K. (2014): Protein kinase B (PknB) of *Mycobacterium tuberculosis* is essential for growth of the pathogen *in vitro* as well as for survival within the host. *J Biol. Chem.* 289(20): 13858–13875.
- Chen, H., Zhuang, H. (2009): Real-time immuno-PCR assay for detecting PCBs in soil samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 394(4): 1205-1211.
- Chen, J.C., Beckwith, J. (2001): FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol.* 42: 395-413.
- Cheng, H., Donahue, J.L., Battle, S.E., Ray, W.K., Larson, T.J. (2008): Biochemical and genetic characterization of PspE and GlpE, two single-domain sulfurtransferases of *Escherichia coli*. *Open Microbiol J.* 2: 18-28.
- Imam-Sghiouar, N., Laude-Lemaire, I., Labas, V., Pflieger, D., Le Caer, J.P., Caron, M., Nabias, D.K., Joubert-Caron, R. (2002): Subproteomics analysis of phosphorylated proteins:

application to the study of B-lymphoblasts from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2: 828–838.

Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M., and Ogasawara, N. (2006): A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 60: 1364–1380.

Ito, J., Taylor, N.L., Castleden, I., Weckwerth, W., Millar, A.H., Heazlewood, J.L. (2009): A survey of the *Arabidopsis thaliana* mitochondrial phosphoproteome. *Proteomics* 9: 4229-4240.

Jensen, S.O., Thompson, L.S., Harry, E.J. (2005): Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-ring assembly. *J Bacteriol.* 187: 6536–6544.

Johnson, L.N., Barford, D. (1993): The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 22: 199–232.

Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., Errington, J. (2001): Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104: 913–922.

Jones, G., Dyson, P. (2006): Evolution of Transmembrane Protein Kinases Implicated in Coordinating Remodeling of Gram-Positive Peptidoglycan: Inside versus Outside. *J Bacteriol.* 188(21): 7470-7476.

de Jong, I., Beilharz, K., Kuipers, O.P., Veening, J.W. (2011): Live cell imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using automated time-laps mikroskopy. *Journal of Vizualized Experiments* 53: 3145.

Julák, J. (2006): Úvod do lékařské bakteriologie. Karolinum, Praha, 404 s.

Jung, K., Fried, L., Behr, S., Heermann, R. (2012): Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol.* 15: 118-124.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., Holmes, K. C. (1990): Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37-44.

Kang, C. M., Abbott, D. W., Park, S. T., Dascher, C. C., Cantley, L. C., Husson, R. N. (2005): The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* 19: 1692–1704.

- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganes, T.S., Spratt, B.G. (1993): Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett. 106: 171–175.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., Koike, T. (2006): Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. Mol Cell. 5: 749–757.
- Kinter, M., Sherman, N.E. (2000): Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Wiley-interscience, USA, 320 s.
- Kocaoglu, O., Calvo, R.A., Sham, L., Cozy, L.M., Lanning, B.R., Francis, S., Winkler, M.E., Kearns, D.B., Carlson, E.E. (2012): Selective Penicillin-Binding Protein Imaging Probes Reveal Substructure in Bacterial Cell Division. ACS Chem Biol. 7 (10): 1746-1753.
- Kramer, K., Hock, B. (2003): Recombinant antibodies for environmental analysis. Anal. Bioanal Chem. 377: 417–426.
- Kristich, C. J., Wells, C. L., Dunny, G. M. (2007): A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. Proc Natl Acad Sci USA 104: 3508–3513.
- Krupka, M., Cabré, E.J., Jiménez, M., Rivas, G., Rico, A.I., Vicente, M. (2014). Role of the FtsA C 646 terminus as a switch for polymerization and membrane association. MBio 5: e02221.
- Krupka, M., Rivas, G., Rico, A.I., Vincente, M. (2012): A key role of two FtsA terminal domains in its idirectional polymerization. J Biol Chem. 287(10): 7756-7765.
- Kruse, T., Bork-Jensen, J., and Gerdes, K. (2005): The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. Mol Microbiol. 55: 78-89.
- Kušnierová, M., Fečko, P. (2001): Minerálne biotechnológie I. v ťažbe a úprave 42 sulfidických ložísk. Ostrava: VŠB – Technická univerzita, 143 s.
- Lahti, R. (1983): Microbial inorganic pyrophosphatases. Microbiol Rev. 47(2): 169-78.
- Land, A.D., Winkler, M.E. (2011): The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. J Bacteriol. 193(16): 4166-4179.
- Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J., Massidda, O. (2005): Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. Mol Microbiol. 55: 699–711.



- Leitner, A. (2010): Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. *Trends Anal Chem.* 29: 177-185.
- Letek, M., Ordonez, E., Vaquera, J., Margolin, W., Flardh, K., et al. (2008) DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 190: 3283–3292.
- Levin, P.A., and Losick, R. (1996): Transcription factor SpoOA switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 10: 478-488.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., Grossman, A.D. (1999): Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9642–9647.
- Li, Y.J., Luo, Y.M., Wu, S.Z., Gao, Y.H., Liu, Y.X., Zheng, D.X. (2009): Nucleic acids in protein samples interfere with phosphopeptide identification by immobilized-metal-ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Biotechnol.* 43: 59–66.
- Li, Y., Thompson, C.M., Lipsitch, M. (2014): A modified Janus Cassette (Sweet Janus) to improve allelic replacement efficiency by high-Stringency negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE* 9(6): e100510.
- Lin, H., He, L., Ma, B. (2013): A combinatorial approach to the peptide feature matching problem for label-free quantification. *Bioinformatics* 29(14): 1768-75.
- Lind, S.B., Molin, M., Savitski, M.M., Emilsson, L., Åström, J., Hedberg, L., Adams, C., Nielsen, M.L., Engström, A., Elfneh, L., Andersson, E., Zubarev, R.A., Pettersson, U. (2008): Immunoaffinity Enrichments Followed by Mass Spectrometric Detection for Studying Global Protein Tyrosine Phosphorylation. *J Proteome Res.* 7 (7): 2897-2910.
- Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J., Weis-Garcia, F. (2005): Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* 46: 258–268.
- Lleó, M.M., Canepari, P., Fontana, R., Satta, G. (1997): Inhibition of bacterial cell surface extension by various means causes blocking of macromolecular synthesis. *Res Microbiol.* 148(1): 11-20.

- Lleo, M.M., Canepari, P., Satta, G. (1990): Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci. *J Bacteriol.* 172: 3758–3771.
- Lovering, A. L., Safadi, S. S., Strynadka, N. C. J. (2012): Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem.* 81: 451–478.
- Lutkenhaus, J., Donachie, W. (1979): Identification of the *ftsA* gene product. *J Bacteriol.* 137: 1088–1094.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., Du, S. (2012): Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome. *Cytoskeleton* 69: 778–790.
- Ma, X., Margolin, W. (1999): Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J Bacteriol.* 181: 7531–7544.
- MacKintosh, C., MacKintosh, R.W. (1994): Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem Sci.* 19: 444-448.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., Séror, S. (2002): Characterization of mebrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol.* 2: 571–586.
- Maestro, B., Nováková, L., Hesek, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J.M., Branny, P. (2011): Recognition of peptidoglycan and  $\beta$ -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEVS Lett.* 585(2): 357-63.
- Maggi, S., Massidda, O., Luzi, G., Fadda, D., Paolozzi, L., Ghelardini, P. (2008): Division protein interaction web: identification of a phylogenetically conserved common interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Microbiology* 154: 3042–3052.
- Machida, M., Kosako, H., Shirakabe, K., Kobayashi, M., Ushiyama, M., Inagawa, J., Hirano, J., Nakano, T., Bando, Y., Nishida, E., Hattori, S. (2007): Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *Febs J.* 274: 1576–1587.
- Mamone, G., Picariello, G., Ferranti, P., Addeo, F. (2010): Hydroxyapatite affinity chromatography for the highly selective enrichment of mono- and multi-phosphorylated peptides in phosphoproteome analysis. *Proteomics.* 10(3): 380-393.

- Marcantonio, M., Trost, M., Courcelles, M., Desjardins, M., Thibault, P. (2008): Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses. *Mol Cell Proteomics* 7: 645–660.
- Margolin, W. (2009): Sculpting the bacterial cell. *Curr Biol.* 19: 812–822.
- Marston, A.L., Errington, J. (1999): Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol.* 33(1): 84-96.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., and Feger, G. (1998): Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 144: 3069–3078.
- Massidda, O., Novakova, L., Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ Microbiol.* 15: 3133–3157.
- Matthies, A., Nimtz, M., Leimkühler, S. (2005): Molybdenum cofactor biosynthesis in humans: identification of a persulfide group in the rhodanese-like domain of MOCS3 by mass spektrometry. *Biochemistry* 44 (21): 7912-7920.
- McNulty, D.E., Annan, R.S. (2008): Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Mol Cellular Proteomics* 7: 971–980.
- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., Rudner, D.Z. (2016): SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* 537: 634-638.
- Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J. (1996): Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 271(1): 32-39.
- Middleton, R. J. (1990): Hexokinases and glucokinases. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 180-183.
- Molina, H., Horn, D.M., Tang, N., Mathivanan, S., Pandey, A. (2007): Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2199–2204.
- Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H., Nasmyth, K. (1991): The role of phosphorylation and the CDC28 protein-kinase in cell-cycle regulated nuclear import of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor SWI15. *Cell* 66: 743–758.

- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2004): The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 51: 1641–1648.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., Vernet, T (2003): Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: Localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol.* 50: 845–855.
- Mueller, E.G., Palenchar, P.M., Buck, C.J. (2001): The role of the cysteine residues of ThiI in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *J Biol Chem.* 276: 33588–33595.
- Mukherjee, A., Lutkenhaus, J. (1994): Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol.* 176(9): 2754-2758.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M. (1991): A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell.* 67(5): 995–1006.
- Mura, A., Fadda, D., Musu, D., Rico, A.I., Krupka, M., Denapaite, D., Branny, P., Vicente, M., Margolin, W., Massidda, O. (2016): Roles of the essential protein FtsA in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 199(3): 608-616.
- Myers, S., Yamazaki, H. (1997): Immunological detection of adulteration of ground meats by meats of other origins. *Biotechnol Tech.* 11: 533–535.
- Neville, D.C.A., Rozanas, C.R., Price, E.M., Gruis, D.B., Verkman, A.S., Townsend, R.R. (1997): Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrixassisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Sci.* 6: 2436–2445.
- Nie, S., Dai, J., Ning, Z.B., Cao, X.J., Sheng, Q.H., Zeng, R. (2010): Comprehensive profiling of phosphopeptides based on anion exchange followed by flow-through enrichment with titanium dioxide (AFET). *J Proteome Res.* 9: 4585–4594.
- Nikolaichik, Y.A., Donachie, W.D. (2000): Conservation of gene order amongst cell wall and cell division genes in Eubacteria, and ribosomal genes in Eubacteria and Eukaryotic organelles. *Genetica* 108: 1–7.
- Nováková L., Bezoušková, S., Pompach, P., Špidlová, P., Sasková, L., Weiser, J., Branny, P. (2010): Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 192: 3629–3638.

- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janecek, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.C., Branny, P. (2005): Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. FEBS J. 272: 1243-1254.
- Oliva, M.A., Halbedel, S., Freund S.M., Dutow, P., Leonard, T.A., Veprintsev, D.B., Hamoen L.W., Löwe, J. (2010): Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. EMBO J. 29: 1988-2001.
- Oliver, C., Jamur, M.C. (2010): Immunocytochemical methods and protocols. Methods Mol Biol. 588: 4-5.
- Oliver, A. W., Knapp, S., Pearl, L. H. (2007): Activation segment exchange: a common mechanism of kinase autophosphorylation? Trends Biochem Sci. 32: 351–356.
- Ortega, C., Liao, R., Anderson, L. N., Rustad, T., Ollodart, A. R., Wright, A. T., Sherman, D. R., and Grundner, C. (2014): *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinase B mediates an oxygen-dependent replication switch. PLoS Biol. 12, e1001746.
- Osaki, M., Arcondéguy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H., Trombel, M. (2009): The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: Cellular organization and physiological characterization. J Bacteriol. 191: 4943–4950.
- Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., Branny, P. (2007): A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer *in vivo*. Biochem Biophys Res Commun. 355: 526–530.
- Pandey, A., Podtelejnikov, A.V., Blagoev, B., Bustelo, X.R., Mann, M., Lodish, H.F. (2000): Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: Identification of Vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci USA 97: 179–184.
- Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., Levesque, R.C. (2005): Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. Protein Eng Des Sel. 18(2): 85-91.
- Paradela, A., Albar, J.P. (2008): Advances in the analysis of protein phosphorylation. J Proteome Res. 7: 1809-1818.
- de Pedro, M.A., Donachie, W.D., Höltje, J.V., and Schwarz, H. (2001): Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein. J Bacteriol. 183: 4115–4126.

- Pereira, S.F., Goss, L., and Dworkin, J. (2011): Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75: 192–212.
- Pérez-Núñez, D., Briandet, R., David, B., Gautier, C., Renault, P., Hallet, B., Hols, P., Carballido-López, R., Guédon, E. (2011): A new morphogenesis pathway in bacteria: unbalanced activity of cell wall synthesis machineries leads to coccus-to-rod transition and filamentation in ovococci. *Mol Microbiol.* 79: 759–771.
- Pichoff, S., Du, S., Lutkenhaus, J. (2015): The bypass of ZipA by overexpression of FtsN requires a previously unknown conserved FtsN motif essential for FtsA-FtsN interaction supporting a model in which FtsA monomers recruit late cell division proteins to the Z ring. *Mol Microbiol.* 95: 971–987.
- Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2002): Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 21: 685–693.
- Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2005): Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol.* 55: 1722–1734.
- Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2007): Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. *Mol Microbiol.* 64: 1129–1138.
- Pichoff, S., Shen, B., Sullivan, B., and Lutkenhaus, J. (2012): FtsA mutants impaired for self-interaction bypass ZipA suggesting a model in which FtsA's self-interaction competes with its ability to recruit downstream division proteins. *Mol Microbiol.* 83: 151-167.
- van der Ploeg, R., Verheul, J., Vischer, N.O., Alexeeva, S., Hoogendoorn, E., Postma, M., *et al.* (2013): Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 87: 1074–1087.
- Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., Herinkson, R.L., Keim, P., Wengl, L., Russell, J. (1978): The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* 273: 124-129.
- Pollard, T. D. (1990): Actin. *Curr Opin Cell Biol.* 2: 33-40.
- Pompeo, F., Foulquier, E., Serrano, B., Grangeasse, C., and Galinier, A. (2015): Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 97: 139–150.

- Posewitz, M.C., Tempst, P. (1999): Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem.* 71: 2883–2892.
- Pucci, M.J., Thanassi, J.A., Discotto, L.F., Kessler, R.E., Dougherty, T.J. (1997): Identification and characterization of cell wall cell division gene clusters in pathogenic gram-positive cocci. *J Bacteriol.* 179: 5632–5635.
- Rajagopal, L., Clancy, A., and Rubens, C.E. (2003): A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem.* 278: 14429–14441.
- Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A. Rubens, C. E. (2005): Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol.* 56: 1329–1346.
- Remelli, W., Guerrieri, N., Klodmann, J., Papenbrock, J., Pagani, S., Forlani, F. (2012): Involvement of the *Azotobacter vinelandii* rhodanese-like protein RhdA in the glutathione regeneration pathway. *PLoS ONE* 7(9): e45193.
- Rico, A.I., García-Ovalle, M., Mingorance, J., Vicente, M. (2004): Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Mol Microbiol.* 53: 1359 –1371.
- Rico, A.I., Krupka, M., Vicente, M. (2013): In the beginning, *Escherichia coli* assembled the proto-ring: an initial phase of division. *J Biol Chem.* 288: 20830–20836.
- Rismondo, J., Cleverley, R.M., Lane, H.V., Grosshennig, S., Steglich, A., Moller, L., Mannala, G.K., Hain, T., Lewis, R.J., Halbedel, S. (2016): Structure of the bacterial cell division determinant GpsB and its interaction with penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* 99: 978–998.
- Rued, B. E., Zheng, J. J., Mura, A., Tsui, H.-C. T., Boersma, M. J., Mazny, J. L., Corona, F., Perez, A. J., Fadda, D., Doubravová, L., Buriánková, K., Branny, P., Massidda, O., Winkler, M. E. (2017): Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of  $\Delta$ *gpsB* mutations indicate that GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol.* 103: 931–957.
- Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E.J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D., Comb, M.J. (2005): Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol.* 23: 94–101.

- Safarik, I., Safarikova, N. (2004): Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides *Biomagn Res Technol.* 2: 7.
- Sanchez, M., Valencia, A., Ferrández, M.-J., Sander, C., and Vicente, M. (1994): Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *EMBO J.* 13: 4919-4925.
- Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., Branny, P. (2007): Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 189(11): 4168-4179.
- Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L., Dworkin, J. (2008): A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135: 486-496.
- Shak, J.R., Vidal, J.E., Klugman, K.P. (2012): Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. *Trends Microbiol.* 21: 129–135.
- Sham, L.T., Tsui, H.C.T., Land, A.D., Barendt, S.M., and Winkler, M.E. (2012): Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr Opin Microbiol.* 15: 194–203.
- Shi, L., Zhang, W. (2004): Comparative analysis of eukaryotic-type protein phosphatases in two streptomycete genomes. *Microbiology* 150: 2247–56.
- Shiomi, D., Sakai, M., and Niki, H. (2008): Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *EMBO J.* 27: 3081–3091.
- Schuster, M., Wasserbauer, E., Neubauer, A., Jungbauer, A. (2000): High speed immuno-affinity chromatography on supports with gigapores and porous glass. *Bioseparation* 9:259–268.
- Silvestroni, A., Jewell, K.A., Lin, W., Connelly, J.E., Ivancic, M.M., Tao, W.A., Rajagopal, L. (2009): Identification of Serine/Threonine Kinase Substrates in the Human Pathogen Group B *Streptococcus*. *J Proteome Res.* 8(5): 2563-2574.
- Simell, B., Auranen, K., Käyhty, H., Goldblatt, D., Dagan, R., O'Brien, K.L. (2012): The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines* 11: 841-855.



- Song, J.H., Ko, K.S., Lee, J.Y., Baek, J.Y., Oh, W.S., Yoon, H.S., Jeong, J.Y., Chun, J. (2005): Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol Cells* 19: 365–374.
- Spallarossa, A., Donahue, J.L., Larson, T.J., Bolognesi, M., Bordo, D. (2001): *Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Structure* 9: 1117-1125.
- Staak, F., Salchow, P.H., Clausen, E. L. (1996): Polystyrene as an affinity chromatography matrix for the purification of antibodies. *J Immunol Methods* 194: 141–146.
- Stamsås, G. A., Straume, D., Ruud Winther, A., Kjos, M., Frantzen, C. A., Håvarstein, L. S. (2017): Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiology* 00(00):00-00.
- Standish, A.J., Morona, R. (2005): The role of bacterial protein tyrosine phosphatases in the regulation of the biosynthesis of secreted polysaccharides. *Antioxid Redox Signal* 20: 2274- 89.
- Standish, A.J., Morona, R. (2014): The role of bacterial protein tyrosine phosphatases in the regulation of the biosynthesis of secreted polysaccharides. *Antioxid Redox Signal*. 20(14): 2274-2289.
- Standish, A.J., Strocher, U.H., Paton, J.C. (2005): The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(21): 7701-7706.
- Standish, A.J., Strocher, U.H., Paton, J.C. (2007): The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *J Bacteriol*. 189(15): 5591-5600.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000): Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 69: 183–215.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C.L., Yin, X.F., Ge, R., Zhang, L.H., He, Q.Y. (2010): Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res*. 9(1): 275–82.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., Morrison, D.A. (2001): An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*. 67: 5190–5196.

- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M.V., Löwe, J. (2012): FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* 31: 2249–2260.
- Tavares, J.R., De Souza, R.F., Meira, G.L.S., and Gueiros-Filho, F.J. (2008): Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol.* 190: 7096–7107.
- Thanassi, J.A., Hartman-Newman, S.L., Dougherty, T.J., Dougherty, B.A., and Pucci, M.J. (2002): Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 30: 3152–3162.
- Thibessard, A., Fernandez, A., Gintz, B., Leblond-Bourget, N., Decaris, B. (2002): Effects of *rodA* and *pbp2b* disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *J Bacteriol.* 184: 2821–2826.
- Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N. G., Brown, J. R., Holmes, D. J., Rosenberg, N., Burnham, MK. (2000): A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 35: 566–576.
- Timms, J.F., Cutillas, P.R. (2010): Overview of quantitative LC-MS techniques for proteomics and activitomics, LC-MS/MS in proteomics. *Methods Mol Biol.* 658: 19-45.
- Tipper, D. J., Strominger, J. L. (1965): Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1133–1141.
- Tombácz, E. (2009): Ph-dependent surface charging of metal oxides. *Periodica Polytechnica: Chemical Engineering* 53(2): 77-86.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2012): From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol.* 10: 123-136.
- Ulijasz, A. T., Andes, D. R., Glasner, J. D., Weisblum, B. (2004): Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol.* 186: 8123-8136.
- Ulijasz, A. T., Falk, S. P., Weisblum, B. (2009): Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser–Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol Microbiol.* 71: 382–390.

- Ulrych, A., Holečková, N., Goldová, J., Doubravová, L., Benada, O., Kofroňová, O., Halada, P., Branny, P. (2016): Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BMC Microbiology* 16:247.
- Unlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S. (1997): Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071–77.
- Verdoliva A, Pannone F, Rossi M, Catello S, Manfredi V. (2002): Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *J Immunol Methods* 271(1-2): 77-88.
- Vicente, M., Rico, A.I., Martínez-Arteaga, R., and Mingorance, J. (2006): Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *J Bacteriol.* 188: 19–27.
- Ville'n, J., Beausoleil, S.A., Gerber, S.A., Gygi, S.P. (2007): Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1488–1493.
- Vinella, D., Joseleau-Petit, D., Thévenet, D., Bouloc, P., and D'Ari, R. (1993): Penicillin-binding protein 2 inactivation in *Escherichia coli* results in cell division inhibition, which is relieved by FtsZ overexpression. *J Bacteriol.* 175: 6704–6710.
- Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M. (2008): Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 149–167.
- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., and Pieters, J. (2004): Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304: 1800–1804.
- Wang, H., Gayda, R.C. (1992): Quantitative determination of FtsA at different growth rates in *Escherichia coli* using monoclonal antibodies. *Mol Microbiol.* 6: 2517-2524.
- Wang, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C., and Lutkenhaus, J. (1997): Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J Bacteriol.* 179: 5551–5559.
- Wang, X., Lutkenhaus, J. (1993): The FtsZ protein of *Bacillus subtilis* is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. *Mol Microbiol.* 9(3): 435-442.
- Wang, L., Lutkenhaus, J. (1998): FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol.* 29: 731–740.

- Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Schaeffer, F., Alzari, P.M. (2007): Structural and binding studies of the three-metal center in two mycobacterial PPM Ser/Thr protein phosphatases. *J Mol Biol.* 374: 890–8.
- Welbeck, K., Leonard, P., Gilmartin, N., Byrne, B., Viguier, C., Arora, S, O’Kennedy R. (2011): *J Immunol Methods* 364: 14–20.
- Wessel, D., Flügge, U.I. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138: 141–143.
- Wheeler, R., Mesnage, S., Boneca, I.G., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2011): Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria. *Mol Microbiol.* 82: 1096–1109.
- Westley, J. (1981): Thiosulfate: Cyanide sulfurtransferase (Rhodanese). *Methods in Enzymology* 77: 285-291.
- Wilkins M.R., Appel R.D., Williams K.L., Hochstrasser D.F. (2007): Proteome research: Concepts, technology and applications. *Proteome Research* 41: 47-52.
- Wolfe, M.D., Ahmed, F., Lacourciere, G.M., Lauhon, C.T., Stadtman, T., Larson, T.J. (2003). Functional diversity of the rhodanese homology domain. *J Biol Chem.* 279(3): 1801-1809.
- Wolschin, F., Wienkoop, S., Weckwerth, W. (2005): Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* 5: 4389–4397.
- Xi, F., Wu, J. (2004): Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent. *J Chromatogr.* 1057: 41-47.
- Xia, Q.W., Cheng, D.M., Duong, D.M., Gearing, M., Lah, J.J., Levey, A.I., Peng, J.M. (2008): Phosphoproteomic analysis of human brain by calcium phosphate precipitation and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 7: 2845–2851.
- Xu, P., Ge, X., Chen, L., Wang, X., Dou, Y., Xu, J.Z., Patel, J.R., Stone, V., Trinh, M., Evans, K., Kitten, T., Bonchev, D., Buck, G.A. (2011): Genome-wide essential gene identification in *Streptococcus sanguinis*. *Sci Rep.* 1: 125.
- Yates, J.R., Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T. (1993): Peptide mass maps - a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem.* 214: 397–408.

- Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002): The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci.* 27: 438.
- Yim, L., Vandenbussche, G., Mingorance, J., Rueda, S., Casanova, M., Ruyschaert, J.M., and Vicente, M. (2000): Role of the carboxy terminus of *Escherichia coli* FtsA in self interaction and cell division. *J Bacteriol.* 182: 6366–6373.
- Young, K. D. (2010): Bacterial shape: two-dimensional questions and possibilities. *Annu Rev Microbiol.* 64: 223–240.
- Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizz, J.A., Falick, A.N., Albert, T. (2003): Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB support a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat Struct Biol.* 10(3): 168-174.
- Zapun, A., Vernet, T., Pinho, M.G. (2008): The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 345–360.
- Zhang, G.A., Neubert, T.A. (2006): Use of detergents to increase selectivity of immunoprecipitation of tyrosine phosphorylated peptides prior to identification by MALDI quadrupole-TOF MS. *Proteomics* 6: 571–578.
- Zhang, X., Ye, J.Y., Jensen, O.N., Roepstorff, P. (2007): Highly efficient phosphopeptide enrichment by calcium phosphate precipitation combined with subsequent IMAC enrichment. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 2032–2042.
- Zhong, L., Zhang, W., Zer, C., Ge, K., Gao, X., Kernstine, K. (2010): Protein microarray: sensitive and effective immunodetection for drug residues. *BMC Biotechnol.* 10: 12.
- Zhou, S.B., Bailey, M.J., Dunn, M.J., Preedy, V.R., Emery, P.W. (2005): A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics* 5: 2739–2747.
- Zhou, H.J., Ye, M.L., Dong, J., Han, G.H., Jiang, X.N., Wu, R.N., Zou, H.F. (2008): Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *J Proteome Res.* 7: 3957–3967.
- Zhou, H.L., Watts, J.D., Aebersold, R. (2001): A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol.* 19: 375–378.
- Zieske, L.R. (2006): A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot.* 57: 1501-1508.